

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CIBLAGE PHARMACOLOGIQUE DU PHÉNOTYPE INVASIF ET  
INFLAMMATOIRE DANS LES CELLULES DE MÉDULLOBLASTOMES

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR  
ERIC VAILLANCOURT-JEAN

FÉVRIER 2012

## UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

Service des bibliothèques

### Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522-Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que « conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire. »

## REMERCIEMENTS

Je tiens premièrement à remercier sincèrement mon directeur de recherche, le Dr. Borhane Annabi, pour son soutien continu et la confiance qu'il m'a octroyée dès le début de ma maîtrise. Ses conseils ainsi que son aide lors des moments les plus difficiles m'ont permis de devenir un meilleur scientifique et une meilleure personne. Le succès des expériences, des articles publiés ainsi que de ma maîtrise toute entière lui est dû en grande partie. Je remercie de plus chaleureusement le Dr. Richard Béliveau. Son dévouement et ses encouragements incessants ont grandement contribué à mon développement scientifique et à ma passion pour la recherche, et il me servira sans aucun doute de modèle lors de mes projets futurs.

Je souhaite aussi remercier mes collègues de laboratoires, Sébastien, Élizabeth, Amélie, Jonathan, Asmaa et Sabrina, pour leur amitié extraordinaire ainsi que leur soutien. Je tiens aussi à remercier vivement Simon, Julie et Karine pour leur support technique et l'enseignement des techniques de biochimie. Merci aussi à mes stagiaires, Tao et Matt, pour les bons moments passés au laboratoire.

J'aimerais remercier aussi le support de l'extérieur; mes parents, Lucie et Raynald, qui ont toujours su croire en moi et m'appuyer, mon frère Martin et toute ma chaleureuse famille. Je souhaite aussi remercier mes amis, vous avez su rendre cette étape de ma vie plus agréable que je ne l'aurais jamais souhaité, et particulièrement ma chère Josée, qui a contribué beaucoup plus qu'elle ne le croit à cet ouvrage. Ceci n'aurait jamais été possible sans vous tous.

Je tiens finalement à souligner la contribution de la fondation de l'UQÀM au financement de ces recherches en m'accordant une bourse au cours de ma maîtrise.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
CHAPITRE I	
INTRODUCTION .....	1
1 Le cancer.....	1
1.1. Généralités et statistiques.....	1
1.2. Cancérogénèse et angiogénèse.....	2
1.3. Symptômes et traitement.....	3
2 Le cancer du cerveau .....	4
2.1. Les médulloblastomes.....	4
2.2. La barrière hémato-encéphalique.....	5
3 Voies de signalisation dans le cancer.....	6
3.1. Axes généraux.....	6
3.1.1 Voies de survie/prolifération.....	6
3.1.2 La voie dépendante de NF- $\kappa$ B .....	8
4 Mécanismes de la cancérogénèse.....	9
4.1. Phénotype invasif.....	9
4.1.1 Rôle de l'inflammation dans l'invasion tumorale.....	9
4.1.2 Implication de COX-2 dans le phénotype inflammatoire .....	11
4.2. Les métalloprotéases matricielles (MMPs).....	12
4.2.1 La matrice extracellulaire.....	12
4.2.2 Familles et rôles des MMPs.....	13
4.2.3 La MMP-2 et le rôle de MT1-MMP .....	14
4.2.4 La MMP-9.....	15

4.2.4.1 Généralités .....	15
4.2.4.2 Synthèse et stabilisation du transcrit primaire .....	15
4.2.4.3 Régulation de l'activité enzymatique.....	16
5 Ciblage pharmacologique de l'invasion et de l'inflammation.....	17
5.1. Ciblage de la signalisation en aval des récepteurs $\beta$ -adrénergiques .....	17
5.2. Ciblage pharmacologique du phénotype inflammatoire .....	18
CHAPITRE II	
PROJET DE RECHERCHE .....	29
CHAPITRE III	
ARTICLES.....	32
1. Pharmacological targeting of $\beta$ -adrenergic receptor functions abrogates NF- $\kappa$ B signalling and MMP-9 secretion in medulloblastoma cells .....	32
Abstract.....	34
Introduction.....	35
Material and methods.....	37
Results.....	40
Discussion .....	44
References .....	50
2. Anti-inflammatory assessment of lupeol within procarcinogenic stimulation reveals MT1-MMP requirement in DAOY medulloblastoma cells .....	61
Abstract.....	63
Introduction.....	64
Material and Methods .....	66
Results.....	69
Discussion .....	72
References .....	76

## CHAPITRE IV

DISCUSSION .....	85
6 Les récepteurs $\beta$ -adrénergiques, médiateurs atypiques dans la signalisation du phénotype invasif tumoral.....	86
7 La modulation pharmacologique de la signalisation pro-inflammatoire .....	87
8 Conclusion et perspectives.....	89
RÉFÉRENCES.....	92

## LISTE DES FIGURES

Figures	Page
1.1 Les caractéristiques fondamentales du cancer .....	20
1.2 Le phénomène de l'angiogénèse .....	21
1.3 Médulloblastome en IRM .....	22
1.4 Perméabilité de la barrière hémato-encéphalique .....	23
1.5 Implication de la voie NF- $\kappa$ B dans l'acquisition d'un phénotype tumoral.....	24
1.6 Contribution de l'inflammation dans la progression tumorale. ....	25
1.7 La famille des métalloprotéases matricielles (MMPs).....	26
1.8 Structure de MMP-2 et MMP-9 .....	27
1.9 Activation de la proMMP-2 par la MT1-MMP .....	28
4.1 Résumé du mode d'action proposé par le propranolol .....	91

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AKT	Protéine kinase B
AP-1	Protéine activatrice 1
ARE	Éléments riches en adénine/uridine
ARN	Acide ribonucléique
bFGF	Facteur de croissance basal des fibroblastes
COX	Cyclooxygénase
CSC	Cellules souches cancéreuses
EGF	Facteur de croissance épidermal
ELAV	<i>"embryonic lethal abnormal vision"</i>
ERK	<i>"Extracellular signal-regulated kinase"</i>
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes
GPI	Glycosyl-phosphatidylinositol
HBMEC	<i>"Human brain microvascular endothelial cells"</i>
IGF	Facteur de croissance homologue à l'insuline
IGFR1	Récepteur à l'IGF-1
I $\kappa$ B	Inhibiteur de kappa-B
IRM	Imagerie de résonnance magnétique
IKK	I $\kappa$ B kinase
LDH	Lactate déshydrogénase
LRP	<i>"low density lipoprotein receptor-related protein"</i>
MAPK	<i>"Mitogen-activated protein kinase"</i>
MEC	Matrice extracellulaire
MEK	<i>"Mitogen-activated protein kinase kinase"</i>
MMP	Métalloprotéase matricielle
MT-MMP	Métalloprotéase matricielle de type membranaire
mTOR	<i>"Mammalian target of rapamycin"</i>
NF- $\kappa$ B	Facteur nucléaire kappa-B
OMS	Organisme mondial de la santé



PCR	Réaction de la polymérase en chaîne
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PTEN	Phosphatase suppresseur de tumeur
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RRM	Motif de reconnaissance de l'ARN
RT-PCR	PCR-Réverse transcriptase
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide – SDS
TGF- $\alpha$	Facteur de croissance transformant $\alpha$
TIMP	Inhibiteur tissulaire des MMPs
TNF	Facteur tumoral nécrotique
TPA	12-0-tetradecanoyl-phorbol 13-acetate
TRE	" <i>(TPA)-responsive elements</i> "
UTR	Région non traduite
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

## RÉSUMÉ

Le médulloblastome, un type hautement agressif de tumeur cérébrale pédiatrique, est l'un des cancers dont le pronostic est le plus sombre dû à la difficulté de s'y attaquer directement et efficacement. L'avenir de la recherche en oncologie repose sur notre capacité à mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la progression d'un néoplasme afin d'identifier les joueurs clés impliqués dans le phénotype invasif tumoral ainsi que de nouvelles cibles nous permettant de tirer profit de ces failles. L'une de celles-ci est la métalloprotéase MMP-9, qui est surexprimée de manière constitutive dans la plupart des cas de cancers et qui contribue fortement au phénomène d'angiogenèse ainsi qu'à la migration invasive des cellules tumorales. Une des voies de signalisation régulant l'expression de la MMP-9 passe par le facteur nucléaire NF- $\kappa$ B, qui est aussi intimement liée à la régulation de COX-2, un médiateur important de l'inflammation dans le microenvironnement tumoral. Sachant que le ciblage pharmacologique de chacune de ces fonctions contribue à la régression tumorale, il apparaît pertinent d'évaluer le caractère thérapeutique *in vitro* de deux agents pharmacologiques, le propranolol ainsi que le lupeol, dont les potentiels anti-tumoraux et anti-inflammatoires respectifs ont été rapportés. Les mécanismes moléculaires à la base de leur activité demeurent cependant peu documentés.

Nous avons donc émis l'hypothèse que, premièrement, le propranolol puisse inhiber la sécrétion de MMP-9 indispensable à la cancérogenèse en bloquant la voie de signalisation NF- $\kappa$ B et que, dans un deuxième temps, le lupeol modulerait négativement l'inflammation au site tumoral en bloquant la synthèse de COX-2 possiblement via la voie NF- $\kappa$ B. Pour ce faire, nous stimulerons *in vitro* la voie de signalisation NF- $\kappa$ B à l'aide d'un agent pro-carcinogène, le PMA, dans un modèle cellulaire tumoral de type DAOY. Les phénotypes invasifs et inflammatoires résultants seront par la suite évalués en réponse aux traitements pharmacologiques. Nos résultats démontrent que le propranolol inhibe l'activation de la voie NF- $\kappa$ B induite par un agent carcinogène de manière dépendante de la dose, diminuant conséquemment la sécrétion de MMP-9. Le mécanisme de notre agent affecte aussi deux autres voies de signalisation cruciales à la cancérogenèse, soit la voie des MAPK et de PI3K/AKT, sans toutefois induire l'apoptose des cellules traitées. Notre seconde hypothèse s'est cependant avérée inexacte puisque, bien que le lupeol module effectivement la voie NF- $\kappa$ B et l'expression de COX-2, elle le fait à la hausse en synergie avec notre agent carcinogène, le PMA. Ces recherches nous ont par contre permis de comprendre une nouvelle modulation du lupeol dans notre modèle néoplasique et d'analyser l'axe de signalisation MT1-MMP, dont la contribution était suspectée, à l'inflammation. De plus, nous avons associé une autre partie du mécanisme moléculaire du lupeol via l'expression de la protéine chaperonne HuR indispensable à la stabilisation du transcrit primaire de MMP-9.

En conclusion, nous avons démontré un nouvel axe signalétique par lequel ces agents pharmacologiques affectent le développement tumoral. Ces données dénotent l'importance de cibler la voie NF- $\kappa$ B afin d'atténuer à plusieurs niveaux le phénotype tumoral et proposent l'implication de cibles thérapeutiques originales telles que les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques dans la cancérogenèse.

**Mots clés :** Médulloblastome, MMP-9, NF- $\kappa$ B, propranolol, récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, COX-2, inflammation, lupeol

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

#### 1 Le cancer

##### 1.1. Généralités et statistiques

Le cancer est devenu en 2011 la principale cause de mortalité des pays industrialisés et la seconde au monde. Depuis 2008, plus de huit millions de personnes décèdent chaque année du cancer, l'équivalent de la population de la ville de Londres. Au Canada seulement, on estime que 177 800 nouveaux cas seront décelés en 2011, et que près de 75 000 personnes en succomberont (Société Canadienne du Cancer, 2011). L'importance de poursuivre la recherche sur cette maladie n'est d'autant plus grande que l'occurrence des cas de cancer augmente chaque année à une vitesse alarmante. En effet, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que le nombre de décès liés au cancer pourrait dépasser les 11 millions annuellement en 2030 si la tendance se maintient (Organisation Mondiale de la Santé, 2011). Malgré tout, des percées importantes ont permis de mieux comprendre, diagnostiquer et guérir cette maladie depuis les dix dernières années grâce à l'innovation de nouveaux agents chimiothérapeutiques (Samant et Shevde, 2011), de la thérapie ciblée (Sanchez-Munoz *et al.*, 2009 ; Tongyoo, 2010) et d'avancées en chirurgie ainsi qu'en radiothérapie (Dahle et Senan, 2010). Sachant maintenant qu'une panoplie de facteurs environnementaux contribuent au développement du cancer, de nombreuses recherches portent sur la prévention du cancer et sur l'impact de notre mode de vie à son développement (Irigaray *et al.*, 2007). Il n'est donc pas étonnant que 30% des cas de cancers pourraient être facilement évités en éliminant certains facteurs de risques liés au mode de vie tels le tabagisme, la malnutrition et la sédentarité (Organisation Mondiale de la Santé, 2011). En fait, l'arrêt du tabagisme permettrait à lui seul d'éradiquer 15% du taux de mortalité lié au cancer chaque année.

## 1.2. Cancérogénèse et angiogénèse

L'apparition d'un cancer survient lorsqu'une cellule de l'organisme subit une altération génétique lui permettant, d'une part, de se diviser de manière anarchique et exponentielle, et d'autre part d'ignorer les signaux provenant de son microenvironnement. Le néoplasme résultant altère sa signature biochimique afin d'assurer sa croissance au détriment de l'organisme hôte. Bien que chaque type de cancer soit unique depuis le tissu dont il origine, toutes les cellules cancéreuses proposent le même phénotype tel que décrit par Hanahan et Weinberg (figure 1). Cette signature biochimique est composée de dix éléments essentiels à la progression et à la survie tumorale et caractérise l'instant où une tumeur est dite maligne (Cavallo *et al.*, 2011 ; Hanahan et Weinberg, 2011).

La croissance rapide et désordonnée de la tumeur engendre cependant un problème majeur d'apport en nutriments et en oxygène. Effectivement, un tissu sain dont la croissance est stable permet le développement concomitant d'un réseau de capillaires sanguins permettant l'échange de nutriments, de métabolites ainsi que d'oxygène (Zetter, 1988). Ce phénomène, nommé angiogénèse, est un processus physiologique normal et indispensable à la vascularisation des tissus. Il s'agit cependant aussi d'un processus pathologique initié par la sécrétion de facteurs de croissance tumoraux. En effet, une tumeur maligne en expansion progresse trop rapidement pour permettre le développement concomitant d'un système adéquat de vascularisation, ce qui engendre un centre hypoxique. En réponse à cette carence, les cellules cancéreuses sécrètent une famille de molécules dites pro-angiogéniques (VEGF, FGF, PDGF, ...) permettant le recrutement accru des vaisseaux sanguins (L'Allemain, 2002). Cette angiogénèse provoquée assure non seulement la croissance de la tumeur, mais incite aussi cette dernière à larguer des cellules tumorales dans la circulation sanguine afin d'envahir un tissu lointain du site d'origine (figure 2). L'implantation d'une tumeur secondaire dans un tissu éloigné se nomme une métastase et est souvent associé à un pronostique sombre dans l'évolution de la maladie (Sanchez, Baker et Miller, 1986).

### 1.3. Symptômes et traitement

L'évolution d'un cancer peut s'étendre sur de nombreuses années tout en passant inaperçu. Effectivement, une tumeur doit atteindre une certaine taille avant d'occasionner des problèmes physiologiques importants à son microenvironnement ainsi qu'à l'organisme. De plus, les symptômes peuvent être variés et facilement confondus à ceux d'une autre maladie. Parmi les symptômes plus généraux, beaucoup de cancers sont associés à une perte de poids soudaine, de la fatigue, de la douleur ainsi que de la fièvre (Carr *et al.*, 2002). Ceux-ci étant cependant peu spécifiques, le diagnostic doit alors reposer sur les symptômes typiques à un type de cancer particulier. Par exemple, le cancer colorectal peut occasionner l'apparition de sang dans les selles (Barrett et McKenna, 2011) alors qu'une migraine sévère et récurrente peut être indicatrice d'une tumeur cérébrale (Lakhan et Harle, 2009). Le dépistage précoce lors de l'apparition de ces signes augmente significativement les chances de guérison. En fait, près du tiers de tous les cas de cancers peuvent être guéris s'ils sont dépistés tôt dans l'évolution de la maladie.

La médecine moderne possède plusieurs outils pour contrecarrer le développement tumoral. La première méthode consiste à extraire chirurgicalement le néoplasme du tissu atteint lorsque cela est possible. Le retrait de la tumeur nécessite l'ablation de toute la zone saine en périphérie afin d'assurer qu'aucune cellule cancéreuse résiduelle ne provoque sa résurgence (Broderson, 1995). La possibilité d'une chirurgie est cependant dépendante de l'emplacement de la tumeur, donc de son type, et de la capacité à y accéder sans endommager les tissus avoisinants. Par exemple, il n'est pas rare qu'un gliome, tumeur cérébrale provenant des cellules gliales du cerveau, soit considéré inapte à la chirurgie s'il n'est pas en périphérie du cerveau et donc facilement accessible. L'ablation physique reste donc, encore à ce jour, le meilleur moyen d'éliminer la totalité d'une tumeur.

Une autre arme que possède la science moderne contre le cancer est la radiothérapie. Fortement utilisée de pair avec l'exérèse chirurgicale, cette méthode consiste à soumettre la zone cible à des radiations ionisantes afin d'infliger des dégâts à l'ADN des cellules touchées (Ross, 1999). Les cellules reçoivent des dommages indirects suite à la formation de radicaux libres générés par le rayonnement du liquide cytoplasmique (Girdhani *et al.*, 2005).

Cette propriété étant dépendante du taux d'oxygène dans la cellule, la radiothérapie semble moins efficace chez la tumeur en hypoxie (Harrison *et al.*, 2002). Une autre arme conventionnelle dans la lutte contre le cancer est la chimiothérapie, soit l'administration d'agents chimiques ciblant les cellules cancéreuses. Jusqu'à ce jour, peu d'agents chimiothérapeutiques sont aptes à cibler spécifiquement les cellules tumorales, occasionnant un lot important d'effets secondaires. Ce domaine a cependant connu beaucoup d'innovation lors des dix dernières années, notamment via la découverte de l'Imatinib, un inhibiteur d'enzymes à activité tyrosine kinase (Breccia, Efficace et Alimena, 2011). Ce médicament, utilisé principalement dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique, est l'un des premiers de sa classe à cibler de manière hautement spécifique les cellules cancéreuses sans affecter les cellules saines (Cohen *et al.*, 2002 ; Etienne et Mahon, 2001).

## **2 Le cancer du cerveau**

### **2.1. Les médulloblastomes**

Sans être l'un des types de cancer les plus communs, le cancer du cerveau est définitivement l'un des plus meurtrier. Même suite à un traitement intensif de la tumeur par chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie, le pronostique des patients atteints ne dépasse en moyenne qu'à peine un an (Kanu *et al.*, 2009). Outre que ce type de tumeur soit reconnu tel l'un des plus invasifs, plusieurs raisons expliquent la difficulté à le traiter. En premier lieu, les cellules tumorales cérébrales sont hautement résistantes à la radiothérapie conventionnelle. Il a été rapporté que des cellules souches cancéreuses, résistantes à la radiothérapie et à la source de récurrence, ont été retrouvées à de nombreuses reprises dans ce type de tumeur (Murat *et al.*, 2008). De plus, l'extraction par chirurgie est souvent impossible à effectuer en raison de la nature fragile du cerveau, et finalement la chimiothérapie est lourdement contrecarrée par la barrière hémato-encéphalique, qui bloque une grande partie des agents avant même leur arrivée à la tumeur (Verhoeff *et al.*, 2009).

La tumeur la plus commune chez les individus de moins de vingt ans est la médulloblastome. Elle se retrouve généralement dans le quatrième ventricule entre le tronc cérébral et le cervelet (figure 3), bien que l'on ignore toujours son origine exacte (Packer,

2005). Étant une tumeur de grade IV, à même titre que plusieurs autres tumeurs cérébrales, elle est hautement agressive et invasive. De plus, en raison de sa proximité au liquide cérébro-spinal, la fréquence d'apparition de métastases à d'autres sites du système nerveux central est élevée (Mazloom, Zangeneh et Paulino, 2010). Le traitement conventionnel de ce type de cancer consiste premièrement en la résection chirurgicale de la masse tumorale, si cela est possible, puis en un traitement intensif de radiothérapie. La chimiothérapie occupe aussi une place de plus en plus prépondérante depuis les 10 dernières années, démontrant des signes encourageants de guérison même chez certains cas de tumeurs malignes métastasées. L'un des médicaments phares de ces dernières percées médicales est le Vismodegib, un inhibiteur de la voie de signalisation Hedgehog (Rudin *et al.*, 2009 ; Von Hoff *et al.*, 2009). De plus, de nombreuses études démontrent les effets néfastes de la radiothérapie sur le cerveau en développement de patients en bas âges, ce qui accroît le besoin de poursuivre la recherche en chimiothérapie (Abayomi, Chun et Kelly, 1990 ; Goldberg *et al.*, 2003).

## **2.2. La barrière hémato-encéphalique**

L'un des obstacles majeurs au traitement efficace du cancer du cerveau par chimiothérapie est le transport de l'agent jusqu'au site tumoral. Effectivement, les vaisseaux sanguins s'y trouvant sont tapissés de cellules endothéliales à jonctions serrées, permettant une meilleure régulation des échanges sang-cerveau (Redzic, 2011). Cette barrière naturelle occupe une place prépondérante dans la fonction cervicale, puisqu'elle régule le ravitaillement et l'homéostasie du système nerveux central. Le cerveau étant un organe extrêmement complexe et sensible, il est impératif qu'il soit mis à l'abri des variations du pH sanguin, des hormones corporelles, des toxines ainsi que des agents pathogènes (Bradbury, 1993). Ce besoin de protection est d'ailleurs mis en évidence par l'incapacité des neurones à se régénérer suite à un dommage important (Ribatti *et al.*, 2006).

L'ensemble des fonctions de la barrière hémato-encéphalique peut se résumer à des échanges par transport actif des nutriments et métabolites par les cellules endothéliales, alors que les jonctions serrées entre ces cellules empêchent le passage des molécules ou même d'ions. Cependant, deux autres types de cellules jouent aussi un rôle prééminent au bon

fonctionnement de la barrière, soit les astrocytes et les péricytes (figure 4) (Kim *et al.*, 2006). Leurs tâches respectives sont la modulation sélective de la perméabilité de la barrière et la régulation de la division ou de la différenciation des cellules endothéliales lors du phénomène de l'angiogénèse (Abbott, Ronnback et Hansson, 2006 ; Choi et Kim, 2008). De multiples pathologies sont associées au fonctionnement erroné de la barrière hémato-encéphalique (Ohtsuki, 2004), notamment la sclérose en plaque (Waubant, 2006), l'épilepsie (Seiffert *et al.*, 2004) et la maladie d'Alzheimer (Banks, 2010). Depuis quelques années, le rôle émergent du cancer dans l'ouverture de la barrière s'ajoute aux conséquences mortelles des tumeurs cérébrales (Schneider *et al.*, 2004), entraînant de lourdes séquelles neurologiques aux patients déjà souvent dévastés par l'action directe de la tumeur. De récentes recherches portent de plus sur le ciblage des capillaires sanguins cérébraux tumoraux, empêchant le phénomène d'angiogénèse de promouvoir la croissance tumorale (Demeule *et al.*, 2004 ; Tahanian *et al.*, 2011). D'autres percées scientifiques proposent plutôt le contournement de la barrière afin d'acheminer certains agents chimiothérapeutiques au site tumoral (Demeule *et al.*, 2008 ; Demeule *et al.*, 2007 ; Groothuis, 2000 ; Karkan *et al.*, 2008).

### **3 Voies de signalisation dans le cancer**

#### **3.1. Axes généraux**

##### **3.1.1 Voies de survie/prolifération**

Les cellules de notre organisme utilisent un réseau extrêmement complexe d'activation, de phosphorylation, de réarrangement ainsi que de dégradation des protéines afin de réguler l'ensemble des activités biochimiques nécessaires à son bon fonctionnement. L'un des défis de la science moderne est par ailleurs d'identifier les acteurs de ces voies de signalisations, de mieux comprendre le rôle de chacune de ses composantes et d'élucider les liens qui les unissent. Ces interactions étant à la base de toute vie sur terre, il n'est pas étonnant de constater que la perte de l'équilibre à n'importe laquelle de ces voies entraîne des conséquences graves à la cellule ainsi qu'à tout son microenvironnement. Plusieurs de ces cascades de signalisation sont centrales dans le développement, la différenciation, la



prolifération et la survie de la cellule. Il a déjà été démontré de plus que la cellule saine a besoin de recevoir une panoplie de signaux externes pour poursuivre sa fonction sans quoi elle entre en mode d'apoptose, soit la mort cellulaire programmée (Bowen, 1993 ; Rubin et Baserga, 1995). En effet, l'une des voies centrales dite de survie est la voie Phosphatidylinositol 3-Kinase / Protéine kinase B (PI3K/AKT) dont la fonction est l'activation de la protéine mTOR, conduisant à l'inhibition des signaux d'apoptose de la cellule et augmentant sa capacité à proliférer (Kennedy *et al.*, 1997). Chez la cellule saine, cette voie de signalisation est dépendante de la liaison de plusieurs facteurs de croissance et de survie aux récepteurs de la cellule, notamment via la liaison de l'IGF-1 (insulin-like growth factor 1) à son récepteur tyrosine kinase, l'IGF1R. L'absence de stimulation par l'IGF-1 entraîne une baisse de l'activation de l'AKT puis de mTOR et en conséquence l'apoptose (Merlo *et al.*, 1995). Il a déjà été démontré que l'une des caractéristiques communes aux cellules cancéreuses est leur indépendance face aux signaux externes, afin que leur développement progresse même lorsque l'organisme tente de les éliminer (Vivanco et Sawyers, 2002). Plusieurs mécanismes sont à la base de cette résistance, premièrement en activant de manière constitutive la voie PI3K/AKT via une mutation de la sous-unité P110 $\alpha$  de PI3K, deuxièmement par l'inhibition de PTEN, un antagoniste important de PI3K, ou finalement via la surexpression du récepteur à IGF-1 (Georgescu, 2010 ; Hailey *et al.*, 2002 ; Sun *et al.*, 2010).

Une autre voie de signalisation indispensable au maintien de l'homéostasie cellulaire est la voie des MAPK. Cette cascade centrale dans la prolifération, la survie et la régulation du cycle cellulaire est l'une des plus larges et des plus enchevêtrées parmi les voies majeures de signalisation (Seger et Krebs, 1995). L'une des portions cruciales est la composante ERK1/2, deux kinases homologues de 42 kDa et 44 kDa respectivement, dont la phosphorylation résulte en l'activation du facteur de transcription Fos nécessaire au passage de l'état G0 à l'état G1 du cycle cellulaire (Crews, Alessandrini et Erikson, 1992). L'activation de ERK1/2 se produit lorsqu'un stimulus, tel que la liaison d'un facteur de croissance à son récepteur, l'activation de la GTPase Ras ou l'activation de la protéine kinase C par un carcinogène tel le phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), résulte en la phosphorylation de la kinase c-Raf (Amos *et al.*, 2005 ; Marshall, 1995). La transduction du signal se poursuit alors par la phosphorylation des kinases kinases MEK1/2 par c-Raf, qui à

leur tour phosphorylent ERK1/2. De nombreux cas de cancers ont vu l'oncogène Raf muté afin d'induire de manière constitutive la phosphorylation de ERK, ce qui résulte en une stimulation de la prolifération cellulaire indépendamment de tout signal externe (Adjei, 2001).

### 3.1.2 La voie dépendante de NF- $\kappa$ B

Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, initialement reconnu pour son rôle dans la réponse immunitaire et le stress cellulaire, a connu beaucoup d'engouement les vingt dernières années en raison de son rôle émergent dans le développement du cancer (Sakamoto et Maeda, 2010 ; Staudt, 2010). Ce complexe protéique est formé, d'une part, d'une protéine de la famille Rel et, d'autre part, de la sous-unité P50 ou P52, formant le dimère NF- $\kappa$ B1 ou NF- $\kappa$ B2 respectivement (Zheng, Yin et Wu, 2011). La régulation de ce facteur est dépendante d'une famille d'inhibiteurs, les I $\kappa$ Bs, qui séquestrent de manière constitutive NF- $\kappa$ B dans le cytoplasme (Beg et Baldwin, 1993). L'activation de cette voie de signalisation, qui peut être occasionnée par la présence d'espèces oxygénées réactives (ROS), du facteur de nécrose tumoral (TNF $\alpha$ ), de certaines cytokines ainsi que par les esters de phorbols, provoque la phosphorylation des membres de la famille I $\kappa$ B par leurs kinases respectives, les IKKs (Bomsztyk *et al.*, 1991). Cette phosphorylation entraîne l'ubiquitination de la protéine, qui se dissocie du complexe NF- $\kappa$ B, puis sa dégradation subséquente par le protéasome. Le facteur de transcription nouvellement libéré est alors apte à transloquer vers le noyau où il active une panoplie de gènes cibles qui sont impliqués notamment dans le développement, la maturation et la prolifération des lymphocytes T, mais aussi dans la plasticité neuronale, la mémoire, la réponse au stress, l'inflammation et finalement l'inhibition de l'apoptose (Kaltschmidt et Kaltschmidt, 2009 ; Romano *et al.*, 2006).

Le dérèglement de cette voie dans le cas de la leucémie est mis en évidence par son rôle prééminent dans la maturation des lymphocytes T (Garg et Aggarwal, 2002). Néanmoins, beaucoup d'autres types de tumeurs bénéficient aussi d'un déséquilibre de cette voie qui régule de plus la survie cellulaire, l'induction de l'inflammation et la production de

métalloprotéases matricielles (figure 5) (Annabi *et al.*, 2009b ; Kwon *et al.*, 2002 ; Seo, 2011). Il n'est donc pas étonnant que près de 10% de la recherche publiée sur les facteurs de transcription porte sur NF- $\kappa$ B seulement, malgré le fait qu'il en existe plusieurs milliers chez l'homme (Chaturvedi *et al.*, 2011). Il a de plus déjà été démontré que cette voie de signalisation participe activement à la promotion de l'angiogénèse via la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques tels le VEGF et l'interleukine 8 (Yoshida *et al.*, 1998), ainsi qu'à la résistance aux agents de chimiothérapie et à la radiothérapie (Baldwin, 2001). Finalement, la plupart des substances carcinogènes et de nombreuses substances pro-inflammatoires activent la voie NF- $\kappa$ B, notamment la lumière UV, la fumée de cigarette, l'alcool, les esters de phorbols, le TNF et la majorité des agents infectieux liés au développement du cancer (Aggarwal, Vijayalekshmi et Sung, 2009).

## **4 Mécanismes de la cancérogénèse**

### **4.1. Phénotype invasif**

#### **4.1.1 Rôle de l'inflammation dans l'invasion tumorale**

L'inflammation est la réponse immunitaire élémentaire à une agression physique (érafure, coupure, brûlure, infection, allergie...), et se manifeste généralement par l'apparition de rougeur, d'une sensation de chaleur, de douleur et d'un œdème. Ce phénomène apparaît dès les premières secondes suite à l'agression et contribue à la protection et à la réparation de la zone touchée, puis à sa rétroinhibition une fois le travail terminé (Furie et Randolph, 1995). Cependant, de nombreuses études supportent la contribution de l'inflammation au phénotype invasif tumoral, plus particulièrement une forme chronique de l'inflammation dans le microenvironnement tumoral (Balkwill et Mantovani, 2001 ; Coussens et Werb, 2002). Effectivement, la phase d'initiation tumorale, caractérisée par la mutation du génome d'une cellule saine, a lieu couramment dans notre organisme sans répercussions néfastes (Slaga, 1983). Une seconde étape à la cancérogénèse, la promotion, est indispensable à l'apparition d'une tumeur à partir de cellules dont le matériel génétique a été muté. Cette étape nécessite l'exposition des cellules concernées à

un irritant d'origine chimique, d'hormones ou encore de l'inflammation (Lewis et Adams, 1987). Il n'est donc pas surprenant de constater que près de 15% des néoplasmes soient initiés de maladies inflammatoires à la base, mais que l'inflammation se retrouve par la suite dans presque tous les cas de tumeurs malignes en développement (Wang *et al.*, 2009). La question à se poser est donc si l'inflammation est la résultante du néoplasme en croissance ou l'opposé. D'une part, le tissu cancéreux est perçu tel un agresseur par l'organisme, qui stimule l'inflammation à son site afin de provoquer l'accumulation de cellules du système immunitaire. Insidieusement, la tumeur utilise plusieurs des fonctions de l'inflammation pour contribuer à sa propre progression (Figure 6). Premièrement, les macrophages ainsi que les métalloprotéases, libérés dans le milieu extracellulaire pour faciliter la diffusion des cellules immunitaires, accélèrent l'angiogénèse tumorale ainsi que l'invasion des tissus sains via la destruction de la matrice extracellulaire et la libération de facteurs de croissance et de cytokines (Sica, 2010 ; Sun, 2010). Deuxièmement, la dilatation et l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins environnants facilitent la libération de cellules cancéreuses dans la circulation (Costa *et al.*, 2002). Troisièmement, le phénotype inflammatoire et la génération de stress oxydatif augmentent la propension aux altérations génétiques et diminuent l'efficacité du système de réparation de dommages à l'ADN (Edwards *et al.*, 2009 ; Martin *et al.*, 2011). L'ensemble de tous les mécanismes qui lient le cancer à l'inflammation est extrêmement large et complexe, mais il apparaît maintenant évident que le blocage de l'inflammation semble un moyen efficace de contrer, ou du moins ralentir, la progression tumorale (Cabodi et Taverna, 2010). Ainsi, certaines études s'intéressent désormais à l'inhibition de l'inflammation dans la prévention du cancer, conférant de nouveaux rôles à de vénérables médicaments comme l'aspirine (Ghosh *et al.*, 2010), ou encore dans le développement de nouveaux composés qui ciblent spécifiquement les inducteurs de l'inflammation chez les cellules tumorales (Trinchieri, 2011). Une large branche de toute la recherche sur la prévention du cancer porte de plus sur le potentiel anti-inflammatoire et antioxydant de substances retrouvées dans notre alimentation (Béliveau et Gingras, 2007 ; Romagnolo, Papoutsis et Selmin, 2010), dénotant une fois de plus l'importance du mode de vie dans l'occurrence de la maladie.

L'une des voies de signalisation cruciales à l'inflammation est celle du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, une cible déjà très attrayante en oncologie de par son implication dans

le phénomène de l'angiogénèse, de la prolifération et de la survie cellulaire (Wu et Zhou, 2010). Effectivement, de nombreuses substances pro-inflammatoires activent cette voie, notamment le TNF, les esters de phorbols et plusieurs cytokines, ce qui résulte en l'activation de gènes codant pour d'autres facteurs pro-inflammatoires par la cellule tels la cyclooxygénase-2 (COX-2) et le TNF (Aggarwal et Sung, 2011 ; Gupta *et al.*, 2011). L'absence de rétro-inhibition ainsi que la présence de ces facteurs dans le microenvironnement amène cette voie à être constitutivement active chez la plupart de cellules tumorales, provoquant ainsi l'inflammation chronique.

#### 4.1.2 Implication de COX-2 dans le phénotype inflammatoire

L'un des marqueurs importants de l'inflammation est la surexpression de l'enzyme COX-2. Cette dernière fait partie d'une famille d'enzymes, les cyclooxygénases, responsables de la catalyse de l'acide arachidonique en prostaglandines. Ceux-ci ont des rôles multiples dans l'organisme, mais l'un des plus importants est l'induction de l'inflammation. L'inhibition complète des cyclooxygénases occasionne plusieurs problèmes, puisque les prostaglandines ont un rôle reconnu dans la protection du tract gastro-intestinal (Radi, 2009). Cependant, contrairement à COX-1 qui est exprimé physiologiquement dans presque tous les tissus, COX-2 est généré majoritairement par l'état d'inflammation (Sano *et al.*, 1995). Ceci a mené au développement de nouveaux médicaments anti-inflammatoires spécifiques à COX-2 permettant de contourner de nombreux problèmes physiologiques.

De nombreuses études supportent l'action anti-tumorale des agents anti-inflammatoires, confirmant l'utilité de leur usage thérapeutique dans le traitement de la maladie (Taketo, 1998). Bien que l'importance de cibler l'inflammation dans la cancérogénèse, ou de manière plus spécifique COX-2, ne fait du sens que dans une optique thérapeutique et non préventive, la compréhension des mécanismes par lequel l'inflammation contribue au phénotype tumoral est cruciale à l'élaboration de stratégies modulant son expression. Ainsi, plusieurs voies de signalisation, notamment NF- $\kappa$ B, ont été associées à un caractère inflammatoire (Karin, 2009). De plus, le lien entre l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B et l'induction de COX-2 par des agents carcinogènes a été démontré à plusieurs reprises (Lee *et al.*, 2011 ; Liu, Ye et Malik, 1999 ; Schmedtje *et al.*, 1997). Une autre étude

propose même un rôle potentiel à COX-2 dans l'inhibition de l'apoptose (Ballif *et al.*, 1996). Il apparaît donc logique que la sécrétion de COX-2, dépendante de la voie NF- $\kappa$ B, soit une cible potentielle dans une thérapie anti-tumorale efficace.

## 4.2. Les métalloprotéases matricielles (MMPs)

### 4.2.1 La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est le support physique auprès duquel les cellules de notre organisme adhèrent. Généralement composée de collagène, d'élastine, de glycoprotéines et de protéoglycanes, cette matrice est responsable de nombreuses fonctions indispensables à la régulation et à la survie des cellules environnantes (Ruoslahti, 1996). Sa structure physique est formée de filaments d'élastine sur lesquels le collagène forme une maille emprisonnant les autres composantes. Les glycoprotéines, et plus particulièrement la fibronectine, permettent l'adhésion des cellules à la matrice, leur assurant un support stable et prompt aux échanges biochimiques (McDonald, 1988). De nombreux facteurs de croissance s'y retrouvent aussi piégés, attendant la dégradation de la matrice lors du phénomène de remodelage cellulaire pour interagir avec les cellules voisines. Effectivement, la MEC est en constant remodelage, conférant une certaine flexibilité aux cellules de l'environnement et remplissant une panoplie de fonctions physiologiques, notamment l'angiogénèse et la migration cellulaire (Ingber et Folkman, 1989). Cependant, étant donné leur rôle primordial dans le support physique ainsi que leur importance dans les échanges entre les cellules, plusieurs pathologies sont associées à un dérèglement de la matrice telles la sclérose en plaque, l'arthrite rhumatoïde et la progression tumorale (Amalinei *et al.*, 2010). Un néoplasme a en effet tout avantage à dégrader rapidement la MEC afin de bénéficier des facteurs de croissance emprisonnés, plus particulièrement le VEGF, le bFGF et le TGF- $\alpha$ , mais aussi afin de faciliter l'angiogénèse tumorale, l'inflammation chronique, la migration des cellules cancéreuses et ultimement la formation de métastases (Kessenbrock, Plaks et Werb, 2010 ; Klein et Bischoff, 2011). Les cellules sécrètent de nombreuses enzymes protéolytiques dans la MEC pour la dégrader, mieux connues sous le nom de métalloprotéases (MMPs). L'une des cibles évidentes dans la lutte au cancer est donc la classe des métalloprotéases, responsables en plusieurs points à l'invasion tumorale.



#### 4.2.2 Familles et rôles des MMPs

La famille des métalloprotéases matricielles (MMPs) (Figure 7) consiste en 23 membres distincts chez l'homme classés en familles selon leur substrat et leur ancrage à la membrane cellulaire si c'est le cas (Kohrmann *et al.*, 2009). Ainsi, les MMPs-1, 2, 8, 9 et 13 sont des collagénases, dont la fonction catalytique consiste à cliver les fibres de collagènes de type I, II et III présentes plus spécifiquement dans le cartilage et les os. Cette propriété leur confère un rôle particulièrement important dans le remodelage et la calcification des os, puisqu'elles sont les seules connues à ce jour chez l'homme capable de dégrader ce type de tissu (Sternlicht et Werb, 2001). Les métalloprotéases 2 et 9 quant à elles sont classées dans la famille des gélatinases, aptes à dégrader le collagène de type IV ainsi que la gélatine de la MEC. Ces dernières sont fortement surexprimées par les cellules tumorales et font l'objet de recherches intensives en oncologie (Fridman *et al.*, 1995 ; Liabakk *et al.*, 1996). Une autre famille de MMPs, les stromélysines, est responsable du clivage d'un large spectre de protéines de la lame basale ainsi que de l'élastine, mais sans action sur les fibres de collagènes retenant les mailles de la matrice. Il existe finalement une dernière famille dite de type transmembranaire, dont tous les membres sont ancrés à la membrane des cellules par une portion transmembranaire, contrairement à leurs homologues solubles des autres familles qui sont largués dans la MEC (Pei, 1999). Bien que différentes par leurs fonctions, les MMPs présentent une structure similaire et bien conservée par l'évolution, commençant par un pro-domaine N-terminal, un domaine catalytique dépendant d'un atome de zinc, une région charnière et finalement un domaine hémopexine C-terminal (figure 8) (Nagase, Visse et Murphy, 2006). Les MMPs transmembranaires possèdent de plus une portion transmembranaire hydrophobe à l'extrémité C-terminale, ainsi qu'une courte queue cytosolique. Lors de la synthèse des MMPs, il existe aussi un pré-domaine précédant le pro-domaine, qui ne servira qu'à diriger la forme primitive de l'enzyme vers le réticulum endoplasmique. L'activation de la protéase nécessite le clivage de la portion pro-domaine suite à son excrétion de la cellule (ou après son ancrage à la membrane si c'est le cas), puisqu'il bloque l'accès au site catalytique. Ce mécanisme est donc dépendant de l'action d'une autre protéase, tel qu'une autre MMP ou une protéase à sérine, ou encore via oxydation par des ROS (Mori, Shibamura et Nose, 2004). L'activité enzymatique est

finement régulée par la présence d'une famille d'inhibiteurs de protéases, les glycoprotéines TIMPs. Ces dernières sont larguées dans la MEC lors de la rétroinhibition du remodelage cellulaire et lient fermement l'atome de zinc sur le site catalytique des MMPs, inhibant leur activité (Bourboulia et Stetler-Stevenson, 2010). Il a été démontré que les TIMPs peuvent aussi interagir avec le domaine hémapexine, dont le rôle connu à ce jour est d'une part d'augmenter la spécificité du substrat à l'enzyme, mais joue de plus un rôle dans l'induction de la migration cellulaire (Dufour *et al.*, 2008 ; Roeb *et al.*, 2002).

Une surexpression de MMP-2, de MMP-9 et de MT1-MMP est fréquemment observée lors de la progression tumorale, suggérant leur implication dans le phénotype invasif tumoral. Étant les seules capables d'hydrolyser le collagène IV constituant la membrane basale, leur rôle dans l'angiogénèse ainsi que dans la migration tumorale est maintenant bien documenté, ainsi que leur implication dans la prolifération cellulaire et l'invasion métastatique (Roy, Yang et Moses, 2009). Ces enzymes sont aussi impliquées dans l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique (Demeule *et al.*, 2004).

#### **4.2.3 La MMP-2 et le rôle de MT1-MMP**

La MMP-2 est sans aucun doute la métalloprotéase la mieux documentée dans les processus cancéreux. Fortement libérée par les néoplasmes en expansion, elle s'accompagne généralement aussi par la surexpression de MT1-MMP aux abords des cellules malignes (Sounni *et al.*, 2002). MT1-MMP possède un très large spectre de cibles moléculaires, notamment les constituants de la MEC tels l'élastine, le collagène et la fibronectine, mais aussi la portion pro-domaine des métalloprotéases 2 et 13. Ainsi, la MMP-2 est sécrétée sous forme inactive alors que MT1-MMP s'ancre à la membrane. S'ensuit alors l'activation de la MMP-2 via le clivage de son pro-domaine par MT1-MMP (Hur *et al.*, 2000), un mécanisme qui est dépendant de l'interaction de TIMP-2 aux deux enzymes concernées (figure 9). Ces dernières procèdent ensuite à la dégradation de la MEC en synergie, libérant de cette dernière une panoplie de facteurs de croissance utiles à la cellule tumorale ainsi qu'au dégagement de la voie facilitant, d'une part, la migration des cellules tumorales ainsi que d'agents pro-inflammatoires, et d'autre part l'accès facilité aux capillaires en croissance soumis à l'angiogénèse. Il a de plus été démontré par notre groupe de recherche que MT1-



MMP participe au phénotype invasif tumoral dans la formation de neurosphères à partir de médulloblastomes (Annabi *et al.*, 2008a). Il a aussi été rapporté que le domaine cytoplasmique de MT1-MMP est un joueur clé dans la transduction de nombreuses voies signalétiques pro-tumorales impliquées notamment dans la survie cellulaire (Fortier *et al.*, 2008) et la résistance à la radiothérapie (Wild-Bode *et al.*, 2001).

#### **4.2.4 La MMP-9**

##### **4.2.4.1 Généralités**

Tel que mentionné précédemment, la MMP-9 est l'une des protéases matricielles les plus importantes au développement tumoral en raison de sa capacité à dégrader le collagène de type IV en plus d'une panoplie d'autres substrats de la MEC. Cette protéase de 92 kDa est sécrétée sous forme inactive dans le milieu extracellulaire à l'instar de son homologue, la MMP-2, où le clivage du pro-peptide permet son activation (Himelstein *et al.*, 1994). De nombreuses autres MMPs peuvent induire son activation, notamment les MMPs -1, -2, -3, -7, -10, -13 et -26 (Van den Steen *et al.*, 2002). L'activité de la MMP-9 est donc dépendante, d'une part, du taux des autres métalloprotéases sécrétées et, d'autre part, de la présence de leurs inhibiteurs de la famille des TIMPs, et plus particulièrement TIMP-1 qui possède une forte affinité pour la MMP-9 (Hornebeck *et al.*, 2005).

##### **4.2.4.2 Synthèse et stabilisation du transcrit primaire**

Le promoteur du gène de MMP-9 contient plusieurs sites de liaison, notamment pour les facteurs de transcription AP-1, Sp1 ainsi que NF- $\kappa$ B, régulant l'expression du transcrit primaire (Kim *et al.*, 2011). Plusieurs voies de signalisation peuvent donc être à l'origine de la surexpression observée chez les cellules cancéreuses tel les facteurs de transcription c-fos et c-jun aux sites de liaison TRE/AP-1, mais il semble que la voie NF- $\kappa$ B soit absolument nécessaire à la surexpression en réponse au PMA, au TNF- $\alpha$  ou encore plusieurs cytokines (Ma *et al.*, 2004 ; Sato et Seiki, 1993). La stabilisation du transcrit primaire est ensuite nécessaire pour mener à bien son processus post-transcriptionnel, étape qui nécessite l'intervention de la protéine chaperon HuR. HuR est membre d'une famille de protéines

ELAV dont il est le seul à être exprimé de manière ubiquitaire dans les tissus de notre organisme (Doller, Pfeilschifter et Eberhardt, 2008). Son implication dans la stabilisation de l'ARNm de la MMP-9 a été évaluée à plusieurs reprises par notre équipe de recherche (Annabi *et al.*, 2006 ; Annabi *et al.*, 2007 ; Annabi *et al.*, 2008b). Il reconnaît spécifiquement les motifs AREs situés sur la région 3'UTR des ARNm d'une centaine de protéines (Meisner et Filipowicz, 2010) grâce à ses domaines de liaison RRM1 et RRM2 (Fan et Steitz, 1998). Un autre de ces domaines, RRM3, reconnaît plutôt la queue poly(A) de l'ARNm. Il a été démontré que toutes ces interactions sont nécessaires à la stabilisation adéquate du transcrit, sans quoi il est ciblé pour la dégradation (Fialcowitz-White *et al.*, 2007). Ce type de régulation permet non seulement d'assurer la qualité de la traduction subséquente mais aussi de gérer le niveau de son expression. Plusieurs études soutiennent que la surexpression d'une protéine telle que la MMP-9 dans le cadre de processus pathologiques requiert la surexpression concomitante de HuR afin de soutenir l'influx de transcrits nucléaires (Huwiler *et al.*, 2003).

#### 4.2.4.3 Régulation de l'activité enzymatique

Dû à son rôle critique dans le milieu extracellulaire, le niveau de MMP-9 est finement régulé par un équilibre entre sa production, son inhibition et sa dégradation. Ayant abordé précédemment toutes les étapes de régulation liées à la synthèse de l'enzyme, il est nécessaire d'énoncer les mécanismes d'inhibition et de dégradation de la MMP-9 subséquents à son action. Il a déjà été mentionné que la famille des TIMPs, et plus spécifiquement TIMP-1, est capable de lier fermement l'atome de zinc au cœur de la protéase, l'inactivant de manière transitoire. D'autres inhibiteurs physiologiques sont aussi connus pour enrayer sa fonction, tels que l' $\alpha$ 2-macroglobuline (Woessner, 1991), mais de nombreuses recherches portent à ce jour sur le développement de nouvelles substances synthétiques capable d'inhiber ces enzymes clés dans la progression tumorale (Rudek, Venitz et Figg, 2002). La dégradation de l'enzyme par endocytose est aussi une méthode très efficace d'abolir sa fonction dans la MEC et de réguler la quantité de MMPs larguées en tout temps. Effectivement, l'endocytose induite par un récepteur est l'un des moyens les plus puissants que possède la cellule d'abaisser le niveau extracellulaire d'une panoplie de facteurs et d'enzymes (Emonard *et al.*, 2005). Ce mécanisme est dépendant des récepteurs

de type « low density lipoprotein receptor-related protein » (LRP) ancrés à la membrane cellulaire et capables de lier notamment la fibronectine, mais aussi de manière plus intéressante certaines MMPs telles que la MMP-2 et la MMP-9. Les protéines séquestrées sont ensuite dégradées par les lysosomes de la cellule (Lillis *et al.*, 2008).

## 5 Ciblage pharmacologique de l'invasion et de l'inflammation

L'art de soigner une maladie à partir d'ingrédients médicaux remonte à la préhistoire, où nos prédécesseurs utilisaient des extraits de végétaux pour soulager la douleur. Par contre, le traitement du cancer par ciblage pharmacologique n'est devenu un concept qu'au 20<sup>ème</sup> siècle où les propriétés d'un premier agent apte à bloquer la division des cellules, le gaz moutarde, ont été découvertes lors de son utilisation au combat (Taffel, 1947). Depuis, une large branche de l'oncologie se spécialise dorénavant à l'étude de substances provoquant la régression tumorale ou s'attaquant du moins à l'un de ses phénotypes (Sellers et Fisher, 1999). Le but ultime de ce type de thérapie est le ciblage spécifique des cellules cancéreuses, mais à défaut d'être parvenu à ce jour à une molécule miracle, le meilleur espoir réside dans la lutte aux promoteurs du microenvironnement tumoral tels que l'inflammation ainsi que les contributeurs de l'invasion du néoplasme dans les tissus avoisinants.

### 5.1. Ciblage de la signalisation en aval des récepteurs $\beta$ -adrénergiques

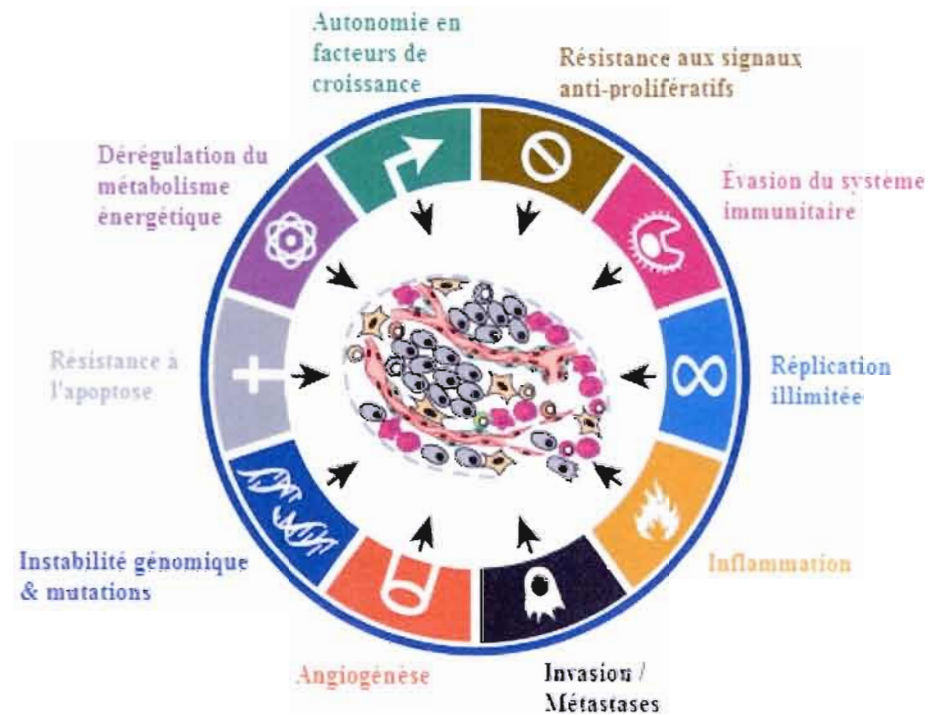
Le propranolol est un agent pharmacologique faisant partie de la classe des  $\beta$ -bloquants, donc apte à bloquer de manière non-spécifique les récepteurs adrénergiques de type bêta. Développé dans les années 50, son rôle historique s'est inscrit dans le traitement ou la prévention de certaines maladies cardiaques telles que l'hypertension artérielle (Prichard et Gillam, 1969), l'infarctus du myocarde (Fonarow, 2006) et l'angine de poitrine (Prichard, 1976). De nombreux autres rôles ont été attribués à cette molécule dont on ne cesse de découvrir de nouvelles propriétés thérapeutiques (Bellot *et al.*, 2008 ; Bonnet, Pierroz et Ferrari, 2008 ; Llorca et Wolf, 1991). L'un des plus récents est son implication dans la régression de l'hémangiome, une tumeur bénigne hautement vascularisée, chez le

nouveau-né. Pour certains de ceux-ci, à la fois affligés d'un hémangiome facial ainsi que de troubles cardiaques, une dose de propranolol leur a été administrée et, étonnamment, la résorption presque complète de la tumeur fut observée. Cette découverte faite en 2008 propose pour la toute première fois l'implication des récepteurs adrénergiques dans un mécanisme anti-tumoral (Leaute-Labreze *et al.*, 2008). Depuis, l'engouement concernant l'utilisation du propranolol contre les hémangiomes ne cesse d'augmenter (Bernabeu-Wittel *et al.*, 2011 ; Shayan, Prendiville et Goldman, 2011 ; Storch et Hoeger, 2010), incitant du même coup à la recherche sur les propriétés anti-tumorales connexes attribuables à cet agent (Fitzgerald, 2010). Des données subséquentes provenant de notre équipe de recherche ont ensuite permis de démontrer que cet agent pharmacologique était capable d'inhiber la tubulogénèse ainsi que la migration des cellules endothéliales microvasculaires (Annabi *et al.*, 2009a), deux phénomènes cruciaux à l'angiogénèse tumorale. Par contre, très peu de données n'existent encore à ce jour sur les mécanismes moléculaires par lesquels cet agent agit. De plus, bien que son efficacité ait été démontrée au niveau du compartiment vasculaire, l'effet du propranolol sur le compartiment tumoral reste à être évalué.

## 5.2. Ciblage pharmacologique du phénotype inflammatoire

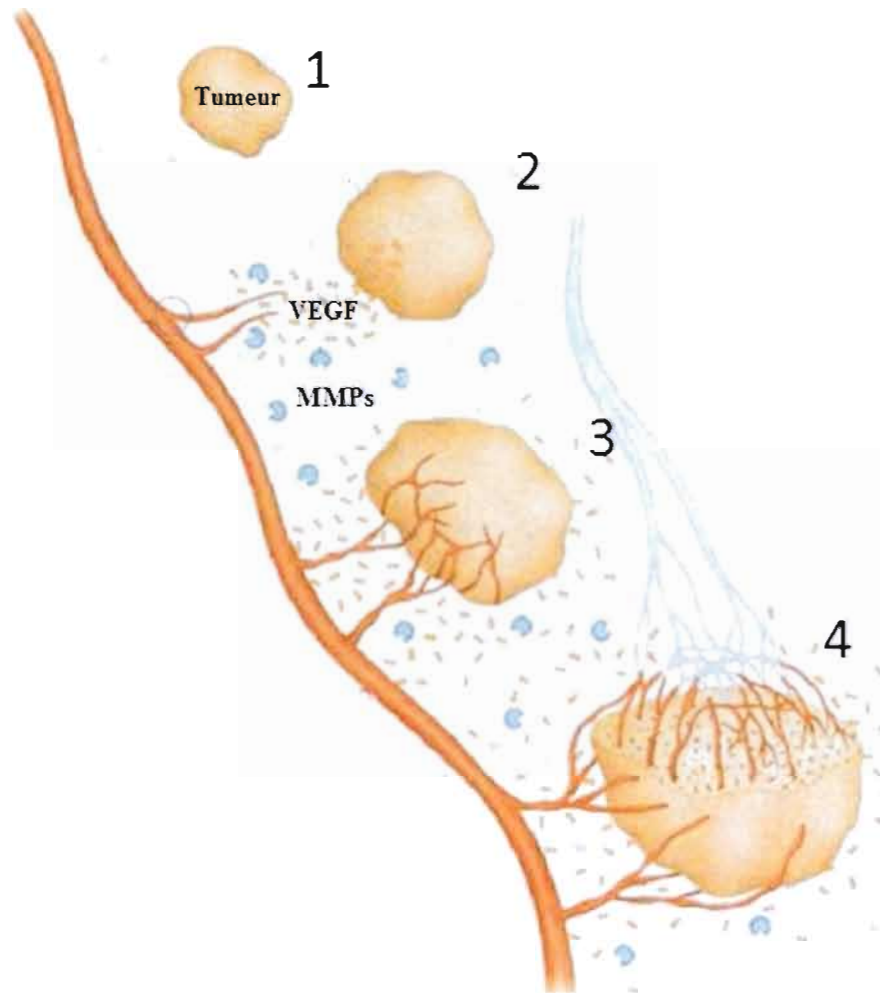
Le lupeol est une molécule naturelle de la classe des triterpènes retrouvée dans de nombreux végétaux ainsi que dans les mangues et les fraises. Plusieurs propriétés pharmacologiques lui ont été associées durant les trois dernières décennies, notamment des effets anti-inflammatoires, anti-angiogéniques et même antiprolifératifs (Saleem *et al.*, 2009). L'un des avantages inhérent à l'utilisation de cet agent est sa très faible toxicité pour les cellules saines, puisqu'il semble cibler spécifiquement les cellules endommagées ou en condition pathologique (Siddique et Saleem, 2011). Le lupeol est aussi capable d'induire l'arrêt de croissance ainsi que l'apoptose chez des cellules cancéreuses hépatiques (He *et al.*, 2011), de la prostate (Khan, Adhami et Mukhtar, 2010), du pancréas (Murtaza *et al.*, 2009) et de la peau (Saleem *et al.*, 2008). Les mécanismes d'actions du lupeol sont nombreux et complexes, modulant l'activité de plusieurs cytokines ainsi que les voies NF- $\kappa$ B, Erk et PI3K/Akt (Saleem, 2009). Sachant que l'inflammation est l'un des processus clé dans la cancérogénèse, le lupeol pourrait être utilisé sur une large gamme de tumeurs à des fins

thérapeutiques. Cependant, mis à part un essai de migration cellulaire (Hata *et al.*, 2005), peu de données existent concernant les effets du lupeol sur le cancer du cerveau.



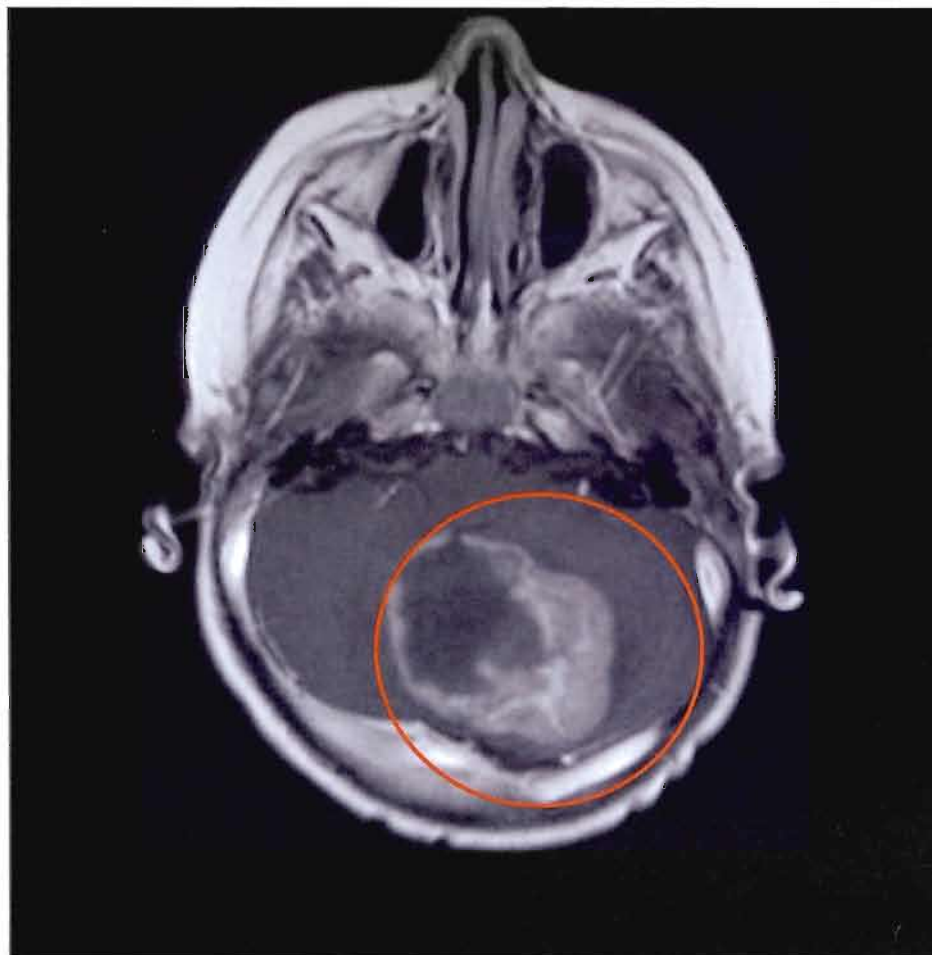
**Figure 1 : Les caractéristiques fondamentales du cancer**

Les 10 signatures biochimiques telles que révisées par Hannahan et Weinberg, d'après le schéma original de 2000. Les deux nouvelles caractéristiques sont la dérégulation du métabolisme énergétique ainsi que l'évasion au système immunitaire. Deux nouvelles caractéristiques promotrices tumorales ont aussi été ajoutées, soit l'instabilité génomique et l'inflammation (Hanahan et Weinberg, 2011).



**Figure 2 : Le phénomène de l'angiogénèse**

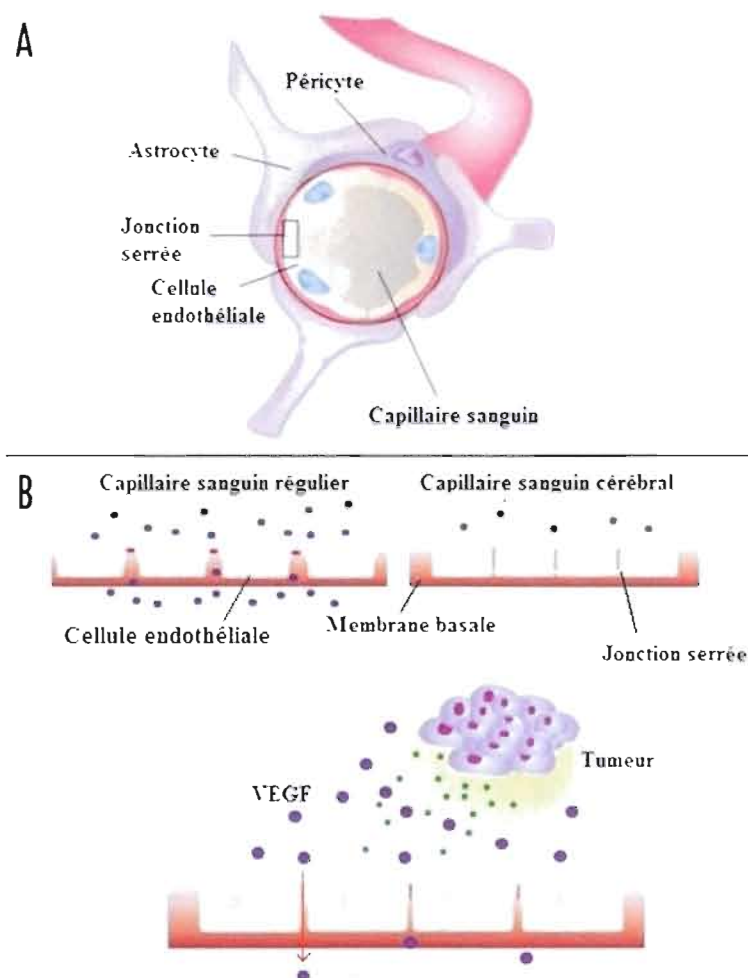
1- Le centre de la tumeur en croissance est sous-alimenté et déficient d'un réseau de vascularisation adéquat. 2- En réponse à l'hypoxie, la tumeur sécrète des facteurs pro-angiogéniques (tel le VEGF) ainsi que des métalloprotéases matricielles (MMPs). Les facteurs atteignent les capillaires sanguins et lymphatiques environnants et induisent leur propagation vers la tumeur. 3- Un réseau de capillaires nouvellement formé s'établit au sein de la tumeur suite à la dégradation de la matrice extracellulaire par les MMPs. 4- La tumeur dorénavant irriguée convenablement poursuit sa croissance. La libération de métastases dans la circulation sanguine est imminente.



**Figure 3 : Médulloblastome en IRM**

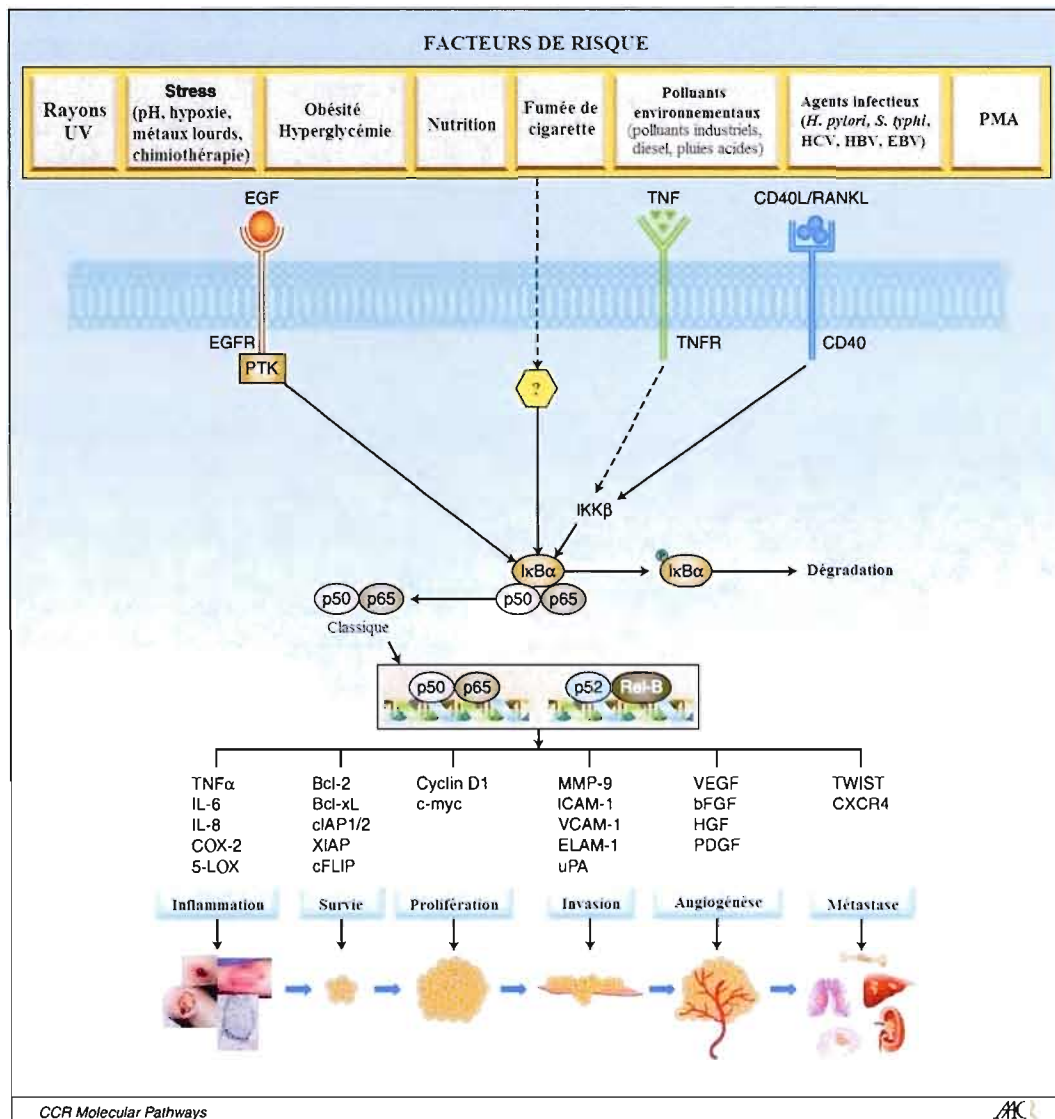
Imagerie par résonance magnétique (IRM) d'un patient atteint d'un médulloblastome au sein du cervelet (Raffel, 2004).





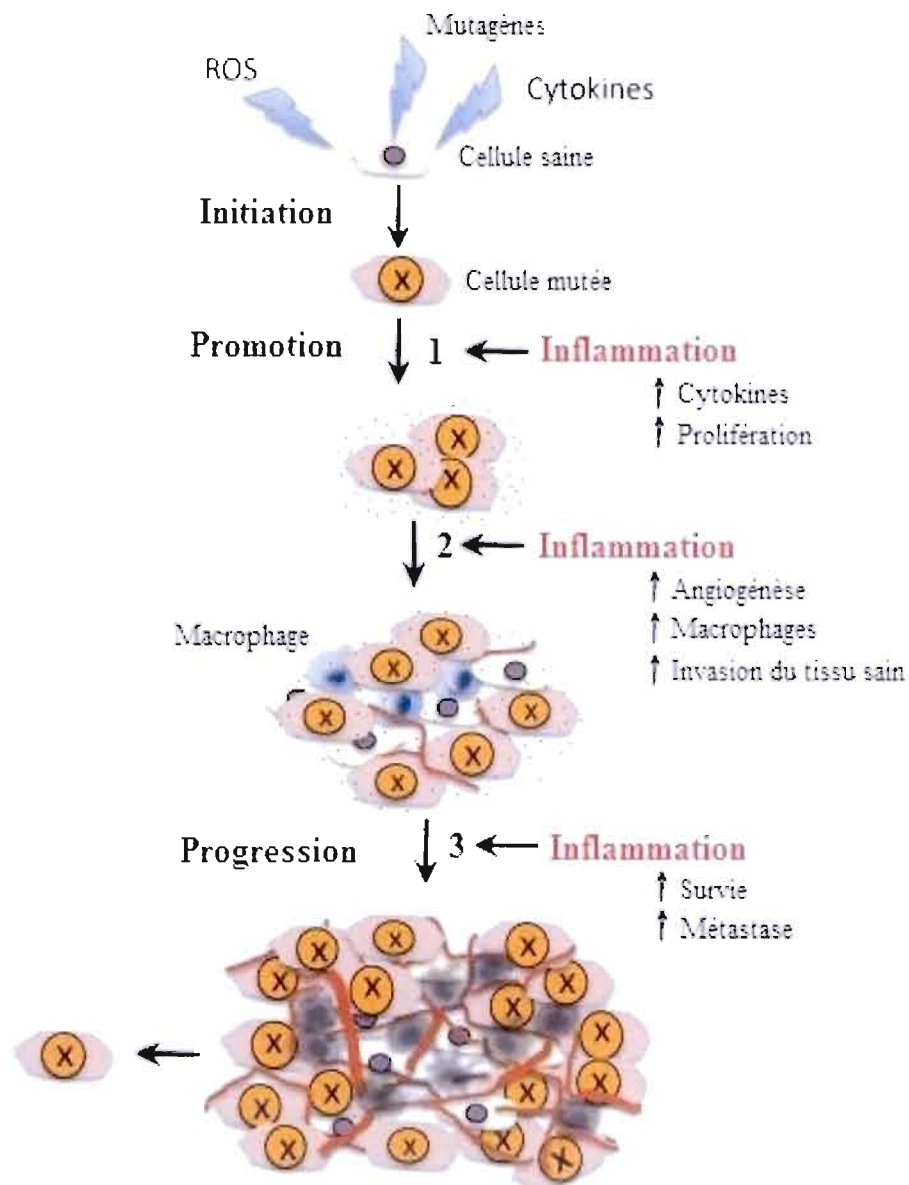
**Figure 4 : Perméabilité de la barrière hémato-encéphalique**

A- Vue de face de la barrière hémato-encéphalique. Les cellules endothéliales entourant fermement le capillaire sanguin sont supportées par les péricytes qui assurent leur développement ainsi que leur différenciation adéquate. Les astrocytes recouvrent la membrane basale du capillaire, contrôlant rigoureusement la perméabilité de la barrière. B- Comparaison d'un vaisseau sanguin régulier et cérébral. Les jonctions serrées empêchent sélectivement le passage d'un grand nombre de substances limitant l'accès au compartiment cellulaire cérébral. Le VEGF sécrété par les cellules tumorales passe à travers cette barrière, déclenchant le phénomène d'angiogénèse. Adapté de *Novel technologies for antiangiogenic drug delivery in the brain* (Benny et Pakneshan, 2009).



**Figure 5 : Implication de la voie NF-κB dans l'acquisition d'un phénotype tumoral**

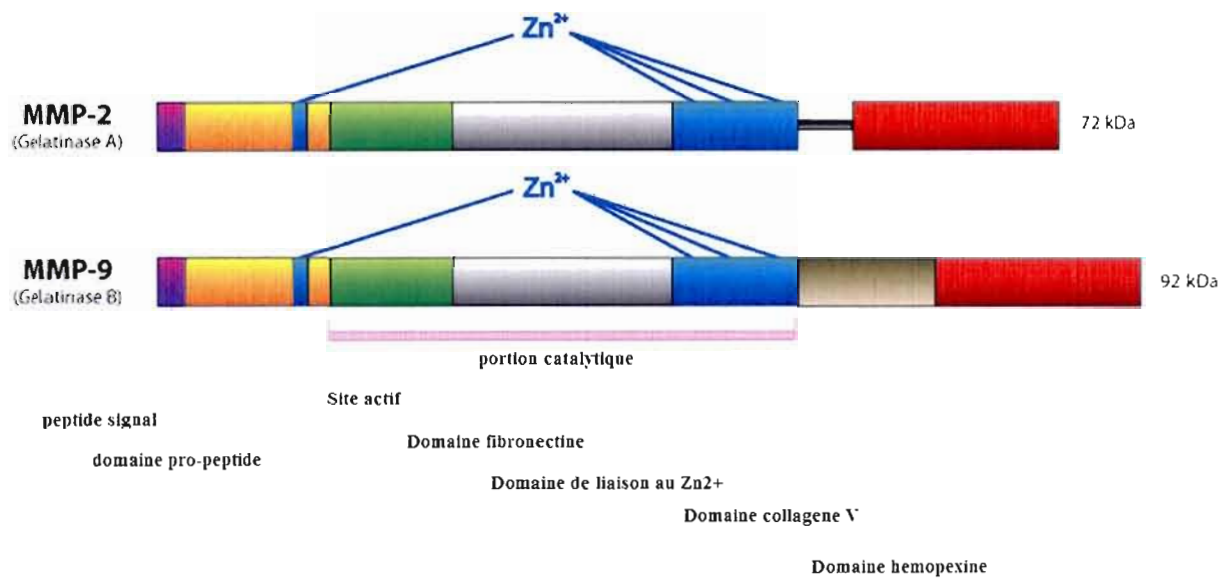
La voie de signalisation NF-κB est centrale à la progression tumorale de par sa contribution à de nombreuses caractéristiques fondamentales des cancers telles qu'énoncées par Hanahan et Weinberg (figure 1). Cette voie peut être activée par de nombreux composés chimiques (Facteur de croissance épidermique (EGF), TNF) via leurs récepteurs respectifs ainsi que par une panoplie de facteurs de risque, dont le mécanisme exact n'a pas encore été démontré. La phosphorylation d'IκB induit sa dissociation du complexe hétéromère p50/p65 qui se transloque par la suite dans le noyau. De nombreux gènes cruciaux au développement tumoral sont régulés par cette voie, notamment l'expression de COX-2, du TNFα, de la MMP-9 et du VEGF. Adapté de *Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe* (Aggarwal, Vijayalekshmi et Sung, 2009).



**Figure 6 : Contribution de l'inflammation dans la progression tumorale.**

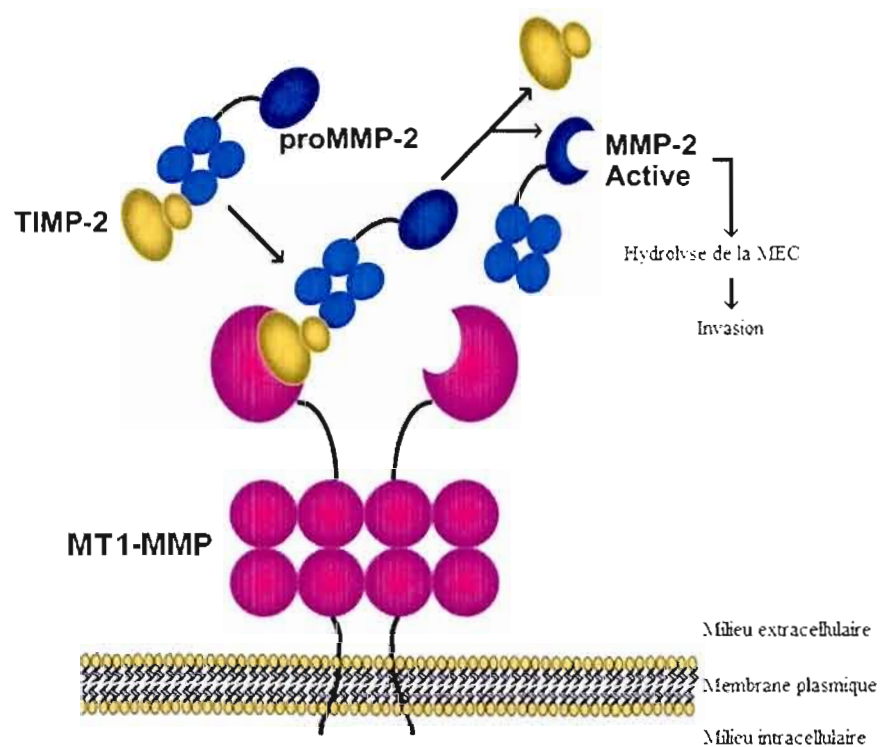
L'inflammation agit à tous les niveaux de la progression tumorale. Lors de l'étape d'initiation, la cellule saine subit certaines mutations génétiques qui n'induisent pas systématiquement l'apparition d'une tumeur. Une seconde étape, la promotion, nécessite la contribution de l'inflammation afin que les cellules mutées prolifèrent en néoplasme. L'inflammation au sein d'un microenvironnement tumoral facilite ensuite le phénomène d'angiogenèse, permettant l'irrigation de la tumeur, et stimule les voies de survie et de prolifération. Finalement, l'inflammation facilite l'étape de progression tumorale et conduit ultimement à la métastase. Adapté de *Immunity, inflammation and cancer* (Grivennikov, Greten et Karin, 2010).





**Figure 1.8 Structure de MMP-2 et MMP-9**

Les gélatinases A (MMP-2) et B (MMP-9) possèdent une structure similaire comprenant les domaines fibronectine et hémopexine. Le site actif ainsi que le domaine de liaison au zinc sont aussi très similaire entre les deux isoformes. Les deux gélatinases sont aptes à cliver le collagène de type V, mais la MMP-9 propose de plus un domaine de reconnaissance à ce substrat, augmentant son affinité (Tveita, Rekvig et Zykova, 2008).



**Figure 1.9 Activation de la proMMP-2 par la MT1-MMP**

L'activation de la proMMP-2 est dépendante de la formation d'un complexe dimérique composé de deux molécules de MT1-MMP. Une première enzyme MT1-MMP interagit via son domaine catalytique avec la portion N-terminale de l'inhibiteur tissulaire de métalloprotéases 2 (TIMP-2), lui-même lié à la proMMP-2. Ce complexe trimérique sert alors d'ancrage à une seconde MT1-MMP active conduisant alors au clivage du pro-domaine de la MMP-2 (Barbolina et Stack, 2008).

## CHAPITRE II

### PROJET DE RECHERCHE

Malgré le développement de nombreux outils pharmacologiques dans la lutte contre le cancer du cerveau, ce dernier demeure difficile à traiter. Premièrement, l'excision chirurgicale n'est pas toujours possible lorsque le foyer tumoral n'est pas situé en périphérie (Verhoeff *et al.*, 2009). Deuxièmement, il a été démontré que certaines cellules souches cancéreuses (CSC) issues de glioblastomes et de médulloblastomes présentent une résistance accrue à la radiothérapie alliée à un fort potentiel de récurrence, sans oublier les séquelles potentielles dues aux dommages collatéraux qu'implique l'ionisation de cellules cérébrales en développement (Murat *et al.*, 2008). Finalement, la barrière hémato-encéphalique représente un obstacle de taille dans l'acheminement de composés chimiothérapeutiques au site tumoral. Toutes ces raisons déplorent l'inexistence d'une méthode efficace pour combattre l'un des types de cancer le plus invasif et fulgurant. Notre laboratoire s'intéresse ainsi à l'élucidation des mécanismes de cibles pharmacologiques qui, malgré une efficacité parfois flagrante, restent mystérieux d'un point de vue moléculaire. Ces cibles peuvent être multiples, notamment la sécrétion de MMP-9 dans le milieu extracellulaire par la cellule tumorale, la migration cellulaire, la tubulogénèse induite lors du phénomène d'angiogénèse et finalement l'expression de la protéine pro-inflammatoire COX-2. Bien qu'aucune de ces dernières ne soit directement responsable de l'incidence d'un néoplasme ou de sa croissance, elles contribuent toutes de concert à promouvoir un microenvironnement propice à la cancérogénèse. L'importance de trouver de nouveaux agents s'attaquant à ces cibles n'en est pas moins cruciale, ainsi que le besoin de mieux comprendre les voies de signalisation impliquées dans leurs mécanismes.

Nous avons choisi d'évaluer le potentiel thérapeutique de deux agents pharmacologiques, soit le propranolol ainsi que le lupeol. Chacun de ces agents agit sur une cible moléculaire cruciale à l'acquisition d'un phénotype invasif tumoral, bien que leur efficacité sur un néoplasme d'origine cérébral n'ait pas encore été systématiquement



évaluée. Nous avons caractérisé le mécanisme de chacune de ces molécules et leur implication potentielle dans la voie NF- $\kappa$ B, centrale dans de nombreux processus invasifs décrits précédemment tels la sécrétion de MMP-9 et l'induction de l'inflammation via l'expression de COX-2.

**Hypothèse de travail #1 : Évaluer et caractériser l'effet anti-invasif du propranolol dans les médulloblastomes de type DAOY.**

L'efficacité anti-tumorale du propranolol a été observée dans une tumeur pédiatrique hautement vascularisée, l'hémangiome (Leaute-Labreze *et al.*, 2008). Bien que de nombreux autres cas aient été rapportés confirmant cet effet pharmacologique (Bernabeu-Wittel *et al.*, 2011 ; Shayan, Prendiville et Goldman, 2011), peu de données existent concernant le mécanisme d'action moléculaire du propranolol. Effectivement, l'implication des récepteurs de type bêta-adrénrgiques dans la cancérogénèse n'a jamais été démontrée auparavant, et aucune cible intracellulaire du propranolol reliée à un processus tumoral n'a été décrite. Notre équipe de recherche a déjà démontré l'inhibition de l'angiogénèse par le propranolol sur une souche cellulaire endothéliale HBMEC, proposant une capacité à réduire la migration de ces cellules en réponse à un chimioattractant ainsi que leur capacité à former des vaisseaux sanguins (Annabi *et al.*, 2009a). Cependant, l'efficacité de cet agent n'a pas encore été vérifiée chez une tumeur cérébrale.

La première étape logique est donc d'évaluer l'effet du propranolol sur notre modèle cellulaire, le médulloblastome de type DAOY. Les niveaux de MMP-9 sécrétés ont été quantifiés à des doses croissantes de propranolol en réponse à un agent carcinogène, l'ester de phorbol (PMA). La modulation de ces niveaux étant une conséquence directe de la modulation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, la cinétique de phosphorylation d'I $\kappa$ B ainsi que sa dégradation subséquente a été vérifiée afin de corréler l'effet de l'agent à un mécanisme moléculaire. Après caractérisation du ciblage pharmacologique de cette voie, nous avons démontré un effet beaucoup plus ample que l'inhibition de l'invasion tumorale via la sécrétion de MMP-9 en analysant son pouvoir sur d'autres voies centrales à la cancérogénèse telles les voies de survie PI3K/AKT ainsi que la voie des MAPK.



**Hypothèse de travail #2 : Évaluer et caractériser l'effet anti-inflammatoire du lupeol dans les médulloblastomes de type DAOY.**

De nombreuses études ont démontré qu'un triterpène retrouvé dans notre alimentation, le lupeol, présente des propriétés anti-inflammatoires et anti-tumorales. Effectivement, sachant que l'inflammation est un processus clé au développement néoplasique, tout ciblage pharmacologique de l'inflammation contribue d'une certaine façon à la régression du cancer. Des recherches précédentes ont démontré que ce potentiel est induit en partie via l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B, un contributeur important au phénotype inflammatoire par l'expression de la protéine COX-2 (Saleem, 2009). Si cette hypothèse s'avère exacte dans notre modèle cellulaire, il ne serait pas exclu de retrouver d'autres effets anti-tumoraux concomitants à une telle modulation de la voie, notamment l'inhibition de la sécrétion de MMP-9 par le compartiment tumoral. De plus, des données précédentes de notre équipe de recherche ont démontré que l'expression de COX-2, dépendante de l'axe NF- $\kappa$ B, est régulée partiellement par une signalisation intracellulaire dépendante de la portion cytosolique de MT1-MMP lorsque stimulé par la concanavaline-A, un agent inducteur de MT1-MMP, dans les glioblastomes (Sina *et al.*, 2010). Le mécanisme à l'origine de cette signalisation est encore nébuleux, mais il est possible que la phosphorylation du résidu Tyr<sup>573</sup> de la portion cytosolique de MT1-MMP par les tyrosines kinases de la famille Src soit impliquée (Nyalendo *et al.*, 2007). Néanmoins, il serait intéressant de faire ce parallèle dans notre modèle cellulaire et, ultimement, démontrer si la modulation de cette voie par le lupeol est dépendante ou non d'un mécanisme dépendant de MT1-MMP suivant une stimulation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. De plus, la MMP-9 n'étant pas un substrat enzymatique de MT1-MMP, il est beaucoup plus aisé d'établir un lien entre l'expression de cette dernière en réponse aux modulations des voies signalétiques cellulaires et l'impact de la signalisation médiée par la portion cytosolique de MT1-MMP. Finalement, la synthèse de MMP-9 étant dépendante de la stabilisation du transcrit primaire par HuR, il est pertinent d'évaluer l'expression génique des composantes de cette voie afin de démontrer si la modulation observée est dépendante uniquement du niveau d'expression du transcrit nucléaire ou de sa stabilisation subséquente.

## CHAPITRE III

### ARTICLES

#### 1. Pharmacological targeting of $\beta$ -adrenergic receptor functions abrogates NF- $\kappa$ B signalling and MMP-9 secretion in medulloblastoma cells

Borhane Annabi<sup>1¶</sup>, Eric Vaillancourt-Jean<sup>1¶</sup>, Alex G. Weil<sup>2</sup> and Richard Béliveau<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie, Centre de Recherche BioMED, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada, <sup>2</sup>Department of Neurosurgery, CHUM-UQAM, Montreal, Québec, Canada*

#### Contributions des auteurs :

**E. Vaillancourt-Jean** : Expérimentation, analyse des résultats, montage des figures et rédaction du manuscrit.

**B. Annabi** : Conception du projet, analyse des résultats, montage des figures et rédaction du manuscrit.

**A. G. Weil** : Expérimentation et analyse des résultats.

**R. Béliveau** : Financement et conception du projet.

Article publié dans le journal scientifique *Oncotargets and Therapy*

**Pharmacological targeting of  $\beta$ -adrenergic receptor functions  
abrogates NF- $\kappa$ B signalling and MMP-9 secretion in  
medulloblastoma cells**

Borhane Annabi<sup>1¶</sup>, Eric Vaillancourt-Jean<sup>1¶</sup>, Alex G. Weil<sup>2</sup> and Richard  
Béliveau<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>*Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie, Centre de Recherche BioMED, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada,* <sup>2</sup>*Department of Neurosurgery, CHUM-UQAM, Montreal, Québec, Canada*

<sup>¶</sup> These authors contributed equally to this work

\* To whom correspondence and reprint requests should be directed

Laboratoire de Médecine Moléculaire  
Université du Québec à Montréal  
C.P. 8888, Succ. Centre-ville  
Montréal, Québec  
CANADA  
H3C 3P8  
Phone : (514) 987-3000 ext 8551  
Fax : (514) 987-0246  
E-mail : beliveau.richard@uqam.ca

*Key words* : Medulloblastoma,  $\beta$ -adrenergic receptors, MMP-9, NF- $\kappa$ B

*Short title* : Propranolol inhibits NF- $\kappa$ B signalling in cancer cells

*The abbreviations used are* : BBB, blood-brain barrier; Erk, extracellular signal-regulated kinase; MMP-9, matrix metalloproteinase-9; NF- $\kappa$ B, nuclear factor- kappa B; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate

### Abstract

Targeting of the vascular endothelium compartment explains, in part, the therapeutic efficacy of the non-selective  $\beta$ -adrenergic antagonist propranolol against common endothelial tumours such as haemangiomas. *In vitro*, the anti-angiogenic biological activity of propranolol was shown to inhibit human brain microvascular endothelial cell tubulogenesis. However, possible interference of propranolol with cell signalling associated with the tumoural compartment remains unexplored. We therefore assessed the potency of propranolol against a pediatric brain tumour-derived DAOY medulloblastoma cell model. Gene expression of  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -, and  $\beta_3$ -adrenergic receptors was confirmed in DAOY cells by semi-quantitative RT-PCR. We next found that propranolol dose-dependently inhibited induction of the key extracellular matrix-degrading and blood-brain barrier disrupting enzyme MMP-9 by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Propranolol not only inhibited PMA-induced phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase (Erk), but also that of I $\kappa$ B (I $\kappa$ B), preventing the I $\kappa$ B phosphorylation which is a prerequisite for I $\kappa$ B degradation. Propranolol inhibition of I $\kappa$ B phosphorylation was shown to occur with optimal efficacy at 30  $\mu$ M. While propranolol, at up to 100  $\mu$ M, did not affect cell viability, it potentiated PMA-mediated signalling that ultimately led to diminished phosphorylation of Akt. The anti-Erk and anti-Akt phosphorylation effects are both suggestive of anti-proliferative and anti-survival signalling, respectively. Our data are therefore indicative of a pharmacological role for propranolol against  $\beta$ -adrenergic receptor signalling functions involving the nuclear factor-kappaB (NF- $\kappa$ B)-mediated regulation of MMP-9.

### Introduction

The expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is significantly increased during tumour progression and is considered as a major contributor to the opening of the blood-brain barrier (BBB).<sup>1</sup> Although human brain microvascular endothelial cells (HBMEC) play an essential role as structural and functional components of the BBB, it is unclear whether MMP-9 that causes its disruption originates from the vascular or the tumoural compartment. Recent evidence from adenoviral-mediated MMP-9 downregulation demonstrated a key role for MMP-9 in endothelial cell network organization as human dermal microvascular endothelial cell migration and capillary-like tube formation were reduced in cell wounding and spheroid migration assays.<sup>2</sup> Aside from involvement in angiogenesis, MMP-9 is also known to be required for tumour vasculogenesis<sup>3</sup>, an alternate pathway for neovascularization that is increasingly being found in a variety of states characterized by vascular growth such as hemangioma.<sup>4</sup> In the latter, MMP-9 was among the increased hypoxia-induced mediators characterizing the stem/progenitor cells in children with hemangioma.<sup>5</sup>

Any therapeutic strategies leading to specific targeting of MMP-9 is therefore likely to be of utility in treating common endothelial tumours such as hemangiomas of infancy. Accordingly, therapeutic targeting of  $\beta$ -adrenergic receptor functions with propranolol was found to efficiently inhibit neovascularization during the proliferative phase of infantile hemangioma.<sup>6, 7</sup> The exact mechanism and signalling pathways involved in this inhibition still remain undefined, and it is believed that marrow-derived endothelial progenitor cells may be partly involved.<sup>5</sup> While recent studies delineated a unique brain endothelial phenotype in which MMP-9 secretion by HBMEC was increased upon treatment with the tumour-promoting agent phorbol 12-myristate 13-acetate<sup>8-10</sup>, the effects of propranolol and

the contribution of  $\beta$ -adrenergic receptor function to the regulation of MMP-9 secretion by the tumour compartment itself has received little attention. In fact, we have shown that MMP-9 is secreted by numerous cell types and that its presence is often indicative of an invasive phenotype during tumour development.<sup>8, 11-14</sup> Leakiness of the vascular endothelium is among the best known of the deleterious brain tumour-associated effects.<sup>15, 16</sup> Whether any  $\beta$ -adrenergic receptor-mediated functions are involved in such events is unknown.

In this study, we used the pediatric brain tumour-derived DAOY cell line model to assess the potential contributions of  $\beta$ -adrenergic receptor functions regulating MMP-9 secretion. Propranolol's pharmacological effects were tested and we provide molecular evidence showing that inhibition of nuclear factor kappaB (NF- $\kappa$ B)-mediated brain tumour signalling specifically reduces the secretion of MMP-9.

## Material and methods

*Materials* : Propranolol, sodium dodecylsulfate (SDS), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma (Oakville, ON). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Perkin Elmer (Waltham, MA). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). The polyclonal antibodies against phospho-ERK, Akt and phospho-Akt were purchased from Cell Signalling (Danvers, MA), the polyclonal anti-ERK antibody was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The monoclonal antibody against GAPDH was from Advanced Immunochemical Inc. (Long Beach, CA). Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse IgG secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). All other reagents were from Sigma-Aldrich Canada.

*Cell culture* : The human DAOY medulloblastoma cell line was purchased from American Type Culture Collection and was maintained in Eagle's Minimum Essential Medium containing 10% (v/v) calf serum (HyClone Laboratories, Logan, UT), 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin. Cells were incubated at 37°C, with 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. PMA and propranolol were diluted in ethanol 100%.

*cDNA synthesis and real-time quantitative RT-PCR* : Total RNA was extracted from cultured DAOY cells using TRIzol reagent. For cDNA synthesis, ~1 µg total RNA was reverse-transcribed into cDNA using an oligo dT primer and the iScript reverse transcriptase

cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Mississauga, ON). cDNA was stored at -20°C for PCR (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA). Human primers for  $\beta 1$ - (QT00204309),  $\beta 2$ - (QT00200011), and  $\beta 3$ - (QT00200004) adrenergic receptors and for Peptidylprolyl isomerase A (PPIA, QT01866137) were from QIAGEN. Semi-quantitative RT-PCR analysis was performed starting with 1  $\mu$ g cDNA, followed by specific gene product amplification with the One-Step RT-PCR Kit (Invitrogen, Burlington, ON). PCR conditions were optimized so that the gene products were examined at the exponential phase of their amplification and the products were resolved on 1.8% agarose gels containing 1  $\mu$ g/ml ethidium bromide.

*Gelatin zymography* : Gelatin zymography was used to assess the extent of proMMP-2 and proMMP-9 activity as previously described.<sup>10</sup> Briefly, an aliquot (20  $\mu$ l) of the culture medium was subjected to SDS-PAGE in a gel containing 0.1 mg/ml gelatin. The gels were then incubated in 2.5% Triton X-100 and rinsed in nanopure distilled H<sub>2</sub>O. Gels were further incubated at 37°C for 20 hrs in 20 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% Brij-35, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6, then stained with 0.1% Coomassie Brilliant blue R-250 and destained in 10% acetic acid, 30% methanol in H<sub>2</sub>O. Gelatinolytic activity was detected as unstained bands on a blue background.

*Immunoblotting procedures* : Proteins from control and treated cells were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). After electrophoresis, proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes which were then blocked for 1 hr at room temperature with 5% non-fat



dry milk in Tris-buffered saline (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) containing 0.3% Tween-20 (TBST). Membranes were further washed in TBST and incubated with the primary antibodies (1/1,000 dilution) in TBST containing 3% bovine serum albumin, followed by a 1 hr incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG (1/2,500 dilution) in TBST containing 5% non-fat dry milk. Immunoreactive material was visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC).

*Cytotoxicity and cell proliferation assays* : To assess the effect of propranolol on DAOY cell viability, the release of lactate dehydrogenase (LDH) upon damage of the plasma membrane, resulting in cell death, was analyzed in the same conditioned media that was used for gelatin zymography. LDH activity was measured at 30 C by a continuous optical test based on the extinction change of pyridine nucleotide at 340 nm as described by the manufacturer's instructions (Promega). The cleavage of the tetrazolium salt WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulphonate) by mitochondrial dehydrogenases (Roche Diagnostics, Laval, QC) was also used to assess proliferation of cells treated with increasing concentrations of propranolol for 48 hours [20].

## Results

*Expression of  $\beta$ -adrenergic receptor transcripts in medulloblastoma-derived DAOY cells.*  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2-, and  $\beta$ 3-adrenergic receptor gene expression was first assessed for medulloblastoma-derived DAOY cells from which total RNA had been extracted. The design of primers enabled measurement of the expression levels for each of the individual human  $\beta$ -adrenergic genes and of the house keeping gene PPIA. This was validated by visualisation of a single cDNA amplicon product obtained from total RNA by semi-quantitative RT-PCR on an agarose gel (Fig.1). This supports that all three  $\beta$ -adrenergic receptors are expressed in DAOY cells.

*Propranolol inhibits PMA-induced secretion of MMP-9 in DAOY medulloblastoma cells.* DAOY cells were serum-starved and treated for 18 hours with various doses of propranolol in the presence or absence of a fixed (1  $\mu$ M) PMA concentration (Fig.2A); other cells were treated with various doses of PMA in the presence or absence of 30  $\mu$ M propranolol (Fig.2B). The conditioned media were harvested to measure the levels of MMP-9 by gelatin zymography. While MMP-9 activity was undetectable under basal conditions (Fig.2A, upper panel), it was significantly increased in PMA-treated cells (Fig.2A, lower panel). When DAOY were treated with combined PMA and propranolol, MMP-9 was dose-dependently inhibited with an  $IC_{50}$  of  $\sim$ 3.1  $\mu$ M propranolol (Fig.2C). Maximal MMP-9 secretion was achieved with PMA at 1  $\mu$ M (Fig.2B, upper panel). This induction was significantly inhibited in the presence of 30  $\mu$ M propranolol (Fig.2D). Collectively, these

results suggest that propranolol efficiently inhibits MMP-9 in response to carcinogenic-promoting conditions.

*Propranolol reverses PMA-mediated I $\kappa$ B decrease.* Among MMP-9 expression regulators, the nuclear factor-kappaB (NF- $\kappa$ B) signalling pathway has been demonstrated to link cancer to inflammatory diseases.<sup>17</sup> We therefore first assessed whether this signalling pathway was activated upon PMA treatment and whether it was reflected in I $\kappa$ B degradation. Cells were treated with 1  $\mu$ M PMA for 18 hours, lysates were isolated and I $\kappa$ B expression was assessed through Western Blotting. PMA signalling led to decreased I $\kappa$ B expression (Fig.3, black bar). Increasing doses of propranolol were found to dose-dependently reverse the PMA-mediated decrease of I $\kappa$ B, suggesting possible signalling interference by propranolol of I $\kappa$ B, whose phosphorylation is essential for its degradation.<sup>18</sup>

*Propranolol inhibits PMA-induced I $\kappa$ B phosphorylation that leads to I $\kappa$ B degradation.* PMA-mediated phosphorylation of I $\kappa$ B was next assessed in order to show whether this explains the subsequent decrease in I $\kappa$ B expression. DAOY cells were treated up to 40 min with 1  $\mu$ M PMA following preincubation with either vehicle or 30  $\mu$ M propranolol. Preincubation with vehicle followed by PMA treatment rapidly led to I $\kappa$ B phosphorylation and to a concomitant decrease in I $\kappa$ B (Fig.4A, left panel). When DAOY cells were preincubated with propranolol, PMA was unable to induce I $\kappa$ B phosphorylation and, consequently, I $\kappa$ B protein levels remained unchanged throughout the 40 min treatment (Fig.4A, right panel). Phosphorylated I $\kappa$ B (Fig.4B) and total I $\kappa$ B (Fig.4C) levels were

quantified by scanning densitometry. While PMA treatment resulted in phosphorylation of Ikb at 20 minutes followed by degradation at around 35 minutes, pre-treatment with propranolol inhibited PMA-mediated phosphorylation of Ikb.

*Propranolol inhibits PMA-induced phosphorylation of Erk, and potentiates PMA-mediated Akt dephosphorylation.* Alternate signalling pathways known to be triggered by PMA include the Erk pathway as well as the Akt pathway.<sup>19,20</sup> Although Erk/Akt signalling cross talks are well documented, the former is involved in cell proliferation<sup>21</sup> while the latter regulates cell survival.<sup>22</sup> Pharmacological  $\beta$ -adrenergic blockade strategies specifically aimed at targeting these two signalling pathways may provide additional tools to reduce DAOY cell proliferation and/or survival. DAOY cells were therefore treated under conditions similar to those shown in Fig.4 (i.e. stimulated for 40 min with 1  $\mu$ M PMA following preincubation with either vehicle or 30  $\mu$ M propranolol). We found that preincubation with vehicle followed by PMA treatment led to increased Erk phosphorylation with no effect on Akt phosphorylation status (Fig.5A, left panel). When DAOY cells were preincubated with propranolol, Erk phosphorylation by PMA was significantly reduced, while phosphorylation levels of Akt decreased as quickly as 10 minutes following PMA stimulation (Fig.5A, right panel). The corresponding ratios of phosphorylated Erk/total Erk (Fig.5B) and of phosphorylated Akt/total Akt (Fig.5C) were quantified by scanning densitometry. Cell proliferation assays confirmed the anti-proliferative effect of propranolol (Fig.6A), while no cell death was induced at up to 100  $\mu$ M propranolol (Fig.6B). The etoposide positive control treatment resulted in nine times cell death compared to control conditions, while propranolol treatment had no significant effect. Collectively, this

experimental evidence suggests that  $\beta$ -adrenergic blockade rather exerts strong anti-proliferative effects combining the converging signalling originating from Erk/Akt pathways.

## Discussion

Propranolol is a non-selective  $\beta$ -adrenergic antagonist that crosses the BBB and which is widely used clinically for various conditions including hypertension, anxiety and excessive sympathetic responses that often characterize patients during the perioperative period.<sup>23</sup> Clinical benefits have been observed in combination with COX-2 inhibitors in post-operation cancer patients, where perioperative treatment resulted in improved immune competence and in reduced risk of tumour metastasis.<sup>24</sup> It was therefore inferred that blockade of  $\beta$ -adrenergic receptor functions would affect tumour development, an effect that was confirmed by the inhibition of experimentally-induced pulmonary adenocarcinoma development.<sup>25</sup> The contribution of  $\beta$ -adrenergic receptor functions to tumorigenesis was also reflected by the suggested antiangiogenic effects of  $\beta$ -blockers on a tumour-associated endothelial cell model<sup>26</sup>. As such, evidence for increased expression of  $\beta$ 2-adrenergic receptors in the brain tumour-derived vascular compartment was demonstrated, and adrenergic blockade with propranolol resulted in the inhibition of HBMEC tubulogenesis. Targeting brain tumour-associated endothelial cell functions with  $\beta$ -blockers, as part of cancer treatments, may therefore become an appealing prospect to be further investigated.

To date, there has been no human clinical study that documents the specific chemotherapeutic effect of propranolol in anti-cancer therapy. *In vivo*, clinical data will ultimately provide definitive proof as to the therapeutic efficacy of propranolol in anti-cancer treatments, and may benefit from our *in vitro* demonstration and elucidation of propranolol's molecular mechanism of action. Among the strongest evidence, and perhaps the best *in vivo* study that supports our current data, is the demonstration that MMP-9 and

the pro-angiogenic factor VEGF are both inhibited by propranolol in nasopharyngeal carcinoma tumour cells.<sup>27</sup> Several other *in vivo* approaches have also shed light on the chemopreventive actions of propranolol in reducing pancreatic ductal adenocarcinoma growth in animal models<sup>28</sup> and in reducing metastatic development of PC-3 prostate cancer in nude mice.<sup>29</sup> Such published data is strongly suggestive of a potent anti-cancer action in line with those we infer in this study using a DAOY pediatric brain tumour-derived cellular model.

One major implication of our study relates to the documented relationship between inflammation and cancer. Increasing evidence suggests that the inflammatory microenvironment in and around tumours is an indispensable participant in the neoplastic process.<sup>30</sup> NF- $\kappa$ B plays an important role in the regulation of inflammatory responses and where NF- $\kappa$ B signaling can be activated by diverse stimuli including proinflammatory cytokines, infectious agents and cellular stresses.<sup>31</sup> It may therefore be appealing in both the prevention and treatment of brain cancers to target NF- $\kappa$ B signalling that regulates, in part, MMP-9 expression. Accordingly, targeting capacity of several pharmacological agents has led to inhibition of MMP-9; these agents include numerous nutraceutical molecules. Among these, sulforaphane<sup>8, 32</sup>, epigallocatechin-gallate<sup>14, 33, 34</sup>, curcumin<sup>35, 36</sup>, resveratrol<sup>37, 38</sup>, proanthocyanidins<sup>39</sup> and lycopene<sup>40</sup> have all been proved to inhibit MMP-9 expression/secretion. More interestingly, all of the above mentioned diet-derived molecules also abrogated the NF- $\kappa$ B signalling pathway which regulates MMP-9 expression.<sup>41</sup>

PMA-induced I $\kappa$ B phosphorylation and subsequent degradation, which together results in the release of NF- $\kappa$ B p65 and p50 subunits followed by their nuclear translocation, subsequently regulates MMP-9 transcription.<sup>42</sup> We show that inhibition of I $\kappa$ B

phosphorylation by propranolol accordingly results in diminished downstream expression of MMP-9 expression. Finally, our data also provide support to the Erk/Akt signaling crosstalk regulating cell proliferation. It is well documented that Erk activation is required for cell proliferation to proceed.<sup>43</sup> Furthermore, biological regulation of Erk nuclear localization has been demonstrated to regulate cell proliferation, while over-activation of Akt has been shown to prevent the nuclear translocation of Erk by stabilizing endogenous PEA15, resulting in cell proliferation restriction.<sup>44</sup> Inhibition of such signalling crosstalk, as we observe for the effect of propranolol, may therefore be viewed as a double check-point control since propranolol not only inhibits Erk phosphorylation status, but would also possibly prevent Akt-mediated Erk nuclear translocation which overall effect will result in blocking cell proliferation in agreement with Fig.6A.

We have previously reported that medulloblastoma-derived cancer stem cells possessed increased MMP-9 expression in neurosphere cultures<sup>13</sup>, and that members of the low-density lipoprotein receptor-related proteins, which also exhibit important functions in MMP-9 recycling<sup>45, 46</sup>, provided a differential molecular signature between parental and CD133+ DAOY medulloblastoma cells.<sup>47</sup> Increased MMP-9 expression was also associated with colospheres derived from colon cancer cultures.<sup>48</sup> Collectively, these data suggest that cancer stem cell targeted strategies involving MMP-9 expression may possibly be envisioned. Whether  $\beta$ -adrenergic blockade would be involved remains to be determined. In support of our current data with brain tumour cells,  $\beta$ 2-adrenergic antagonists suppressed pancreatic cancer cell invasion by inhibiting NF- $\kappa$ B and MMP-9 expression<sup>49</sup>, while MMP-9 levels were decreased upon  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-adrenoceptor blockade.<sup>50</sup> In summary, our data are indicative of a role for propranolol against carcinogen-mediated signalling that leads to the



secretion of the BBB disruptor enzyme MMP-9. Our results also illuminate the alternate roles that excessive MMP-9 expression may play in inflammatory diseases and in inflammation associated with tumour development.

### **Acknowledgments**

BA holds a Canada Research Chair in Molecular and Metabolic Oncology from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). RB holds both an Institutional UQAM Research Chair in Cancer Prevention and Treatment, and the Claude Bertrand Chair in Neurosurgery (CHUM). This study was funded by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to RB.

### Disclosure

The authors declare they have no competing interests.

## References

1. Shigemori Y, Katayama Y, Mori T, Maeda T, Kawamata T. Matrix metalloproteinase-9 is associated with blood-brain barrier opening and brain edema formation after cortical contusion in rats. *Acta Neurochir Suppl.* 2006;96:130-133.
2. Jadhav U, Chigurupati S, Lakka SS, Mohanam S. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces in vitro invasion and angiogenesis in human microvascular endothelial cells. *Int J Oncol.* 2004;25:1407-1414.
3. Ahn GO, Brown JM. Matrix metalloproteinase-9 is required for tumour vasculogenesis but not for angiogenesis: role of bone marrow-derived myelomonocytic cells. *Cancer Cell.* 2008;13:193-205.
4. Boscolo E, Bischoff J. Vasculogenesis in infantile hemangioma. *Angiogenesis.* 2009;12:197-207.
5. Kleinman ME, Greives MR, Churgin SS, et al. Hypoxia-induced mediators of stem/progenitor cell trafficking are increased in children with hemangioma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:2664-2670.
6. Léauté-Labrèze C, Dumas de la Roque E, Hubiche T, Boralevi F, Thambo JB, Taïeb A. Propranolol for severe hemangiomas of infancy. *N Engl J Med.* 2008;358:2649-2651.
7. Siegfried EC, Keenan WJ, Al-Jureidini S. More on propranolol for hemangiomas of infancy. *N Engl J Med.* 2008;359:2846; author reply 2846-2847.
8. Annabi B, Rojas-Sutterlin S, Laroche M, Lachambre MP, Moundjian R, Béliveau R. The diet-derived sulforaphane inhibits matrix metalloproteinase-9-activated human brain microvascular endothelial cell migration and tubulogenesis. *Mol Nutr Food Res.* 2008;52:692-700.
9. Roomi MW, Monterrey JC, Kalinovsky T, Rath M, Niedzwiecki A. Distinct patterns of matrix metalloproteinase-2 and -9 expression in normal human cell lines. *Oncol Rep.* 2009;21:821-826.
10. Sina A, Lord-Dufour S, Annabi B. Cell-based evidence for aminopeptidase N/CD13 inhibitor actinonin targeting of MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation. *Cancer Lett.* 2009;279:171-176.
11. Abécassis I, Olofsson B, Schmid M, Zalcman G, Karniguian A. RhoA induces MMP-9 expression at CD44 lamellipodial focal complexes and promotes HMEC-1 cell invasion. *Exp Cell Res.* 2003;291:363-376.
12. Demeule M, Régina A, Annabi B, Bertrand Y, Bojanowski MW, Béliveau R. Brain endothelial cells as pharmacological targets in brain tumours. *Mol Neurobiol.* 2004;30:157-183.

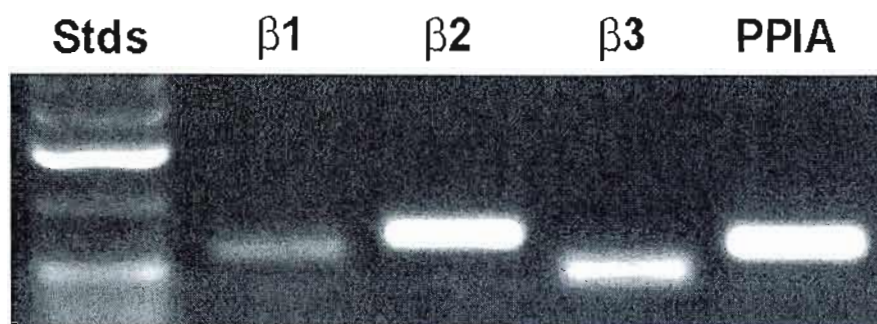
13. Annabi B, Rojas-Sutterlin S, Laflamme C, et al. Tumour environment dictates medulloblastoma cancer stem cell expression and invasive phenotype. *Mol Cancer Res.* 2008;6:907-916.
14. Annabi B, Currie JC, Moghrabi A, Béliveau R. Inhibition of HuR and MMP-9 expression in macrophage-differentiated HL-60 myeloid leukemia cells by green tea polyphenol EGCg. *Leuk Res.* 2007;31:1277-1284.
15. Higashida T, Kreipke CW, Rafols JA, et al. The role of hypoxia-inducible factor-1alpha, aquaporin-4, and matrix metalloproteinase-9 in blood-brain barrier disruption and brain edema after traumatic brain injury. *J Neurosurg.* In press 2010.
16. Tsuge M, Yasui K, Ichiyawa T, et al. Increase of tumour necrosis factor-alpha in the blood induces early activation of matrix metalloproteinase-9 in the brain. *Microbiol Immunol.* 2010;54:417-424.
17. Dong J, Jimi E, Zeiss C, Hayden MS, Ghosh S. Constitutively active NF-kappaB triggers systemic TNFalpha-dependent inflammation and localized TNFalpha-independent inflammatory disease. *Genes Dev.* 2010;24:1709-1717.
18. Solt LA, May MJ. The IkappaB kinase complex: master regulator of NF-kappaB signalling. *Immunol Res.* 2008;42:3-18.
19. Agarwal R, Agarwal C, Ichikawa H, Singh RP, Aggarwal BB. Anticancer potential of silymarin: from bench to bed side. *Anticancer Res.* 2006;26:4457-4498.
20. Shioda N, Han F, Fukunaga K. Role of Akt and ERK signalling in the neurogenesis following brain ischemia. *Int Rev Neurobiol.* 2009;85:375-387.
21. Burkhard K, Smith S, Deshmukh R, MacKerell AD Jr, Shapiro P. Development of extracellular signal-regulated kinase inhibitors. *Curr Top Med Chem.* 2009;9:678-689.
22. Dillon RL, Muller WJ. Distinct biological roles for the akt family in mammary tumour progression. *Cancer Res.* 2010;70:4260-4264.
23. Emilien G, Maloteaux JM. Current therapeutic uses and potential of beta-adrenoceptor agonists and antagonists. *Eur J Clin Pharmacol.* 1998;53:389-404.
24. Benish M, Bartal I, Goldfarb Y, et al. Perioperative use of beta-blockers and COX-2 inhibitors may improve immune competence and reduce the risk of tumour metastasis. *Ann Surg Oncol.* 2008;15:2042-2052.
25. Park PG, Merryman J, Orloff M, Schuller HM. Beta-adrenergic mitogenic signal transduction in peripheral lung adenocarcinoma: implications for individuals with preexisting chronic lung disease. *Cancer Res.* 1995;55:3504-3508.

26. Annabi B, Lachambre MP, Plouffe K, Moumdjian R, Béliveau R. Propranolol adrenergic blockade inhibits human brain endothelial cells tubulogenesis and matrix metalloproteinase-9 secretion. *Pharmacol Res.* 2009;60:438-445.
27. Yang EV, Sood AK, Chen M. et al. Norepinephrine up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 in nasopharyngeal carcinoma tumour cells. *Cancer Res.* 2006;66:10357-10364.
28. Al-Wadei HA, Al-Wadei MH, Schuller HM. Prevention of pancreatic cancer by the beta-blocker propranolol. *Anticancer Drugs.* 2009;20:477-482.
29. Palm D, Lang K, Niggemann B. et al. The norepinephrine-driven metastasis development of PC-3 human prostate cancer cells in BALB/c nude mice is inhibited by beta-blockers. *Int J Cancer.* 2006;118:2744-2749.
30. Wang H, Cho CH. Effect of NF- $\kappa$ B Signalling on Apoptosis in Chronic Inflammation-Associated Carcinogenesis. *Curr Cancer Drug Targets.* In press 2010.
31. Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest.* 2001;107:7-11.
32. Moon DO, Kim MO, Kang SH, Choi YH, Kim GY. Sulforaphane suppresses TNF-alpha-mediated activation of NF-kappaB and induces apoptosis through activation of reactive oxygen species-dependent caspase-3. *Cancer Lett.* 2009;274:132-142.
33. Sen T, Dutta A, Chatterjee A. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) downregulates gelatinase-B (MMP-9) by involvement of FAK/ERK/NFkappaB and AP-1 in the human breast cancer cell line MDA-MB-231. *Anticancer Drugs.* 2010;21:632-644.
34. Farabegoli F, Papi A, Orlandi M. (-)-Epigallocatechin-3-gallate downregulates EGFR, MMP-2, MMP-9 EMMPRIN and inhibits the invasion of MCF-7 tamoxifen resistant cells. *Biosci Rep.* In press 2010.
35. Bangaru ML, Chen S, Woodliff J, Kansra S. Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis and blocks migration of human medulloblastoma cells. *Anticancer Res.* 2010;30:499-504.
36. Yu YM, Lin HC. Curcumin prevents human aortic smooth muscle cells migration by inhibiting of MMP-9 expression. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2010;20:125-132.
37. Bedirli A, Salman B, Pasaoglu H, Ofluoglu E, Sakrak O. Effects of Nuclear Factor-kappaB Inhibitors on Colon Anastomotic Healing in Rats. *J Surg Res.* In press 2010.
38. Liu PL, Tsai JR, Charles AL, et al. Resveratrol inhibits human lung adenocarcinoma cell metastasis by suppressing heme oxygenase 1-mediated nuclear factor-kappaB pathway and subsequently downregulating expression of matrix metalloproteinases. *Mol Nutr Food Res.* 2010;54:S196-204.

39. Déziel BA, Patel K, Neto C, Gottschall-Pass K, Hurta RA. Proanthocyanidins from the american cranberry (*vaccinium macrocarpon*) inhibit matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 activity in human prostate cancer cells via alterations in multiple cellular signalling pathways. *J Cell Biochem*. In press 2010.
40. Hwang ES, Lee HJ. Inhibitory effects of lycopene on the adhesion, invasion, and migration of SK-Hep1 human hepatoma cells. *Exp Biol Med* (Maywood). 2006;231:322-327.
41. Ralhan R, Pandey MK, Aggarwal BB.. Nuclear factor-kappa B links carcinogenic and chemopreventive agents. *Front Biosci* (Schol Ed). 2009;1:45-60.
42. St-Pierre Y, Couillard J, Van Themsche C. Regulation of MMP-9 gene expression for the development of novel molecular targets against cancer and inflammatory diseases. *Expert Opin Ther Targets*. 2004;8:473-489.
43. Chambard JC, Lefloch R, Pouysségur J, Lenormand P. ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773:1299-1310.
44. Gervais M, Dugourd C, Muller L, Ardidie C, Canton B, Loviconi L, Corvol P, Chneiweiss H, Monnot C. Akt down-regulates ERK1/2 nuclear localization and angiotensin II-induced cell proliferation through PEA-15. *Mol Biol Cell*. 2006;17:3940-3951.
45. Desrosiers RR, Rivard ME, Grundy PE, Annabi B. Decrease in LDL receptor-related protein expression and function correlates with advanced stages of Wilms tumors. *Pediatr Blood Cancer*. 2006;46:40-49.
46. Jin R, Yang G, Li G. Molecular insights and therapeutic targets for blood-brain barrier disruption in ischemic stroke: critical role of matrix metalloproteinases and tissue-type plasminogen activator. *Neurobiol Dis*. 2010;38:376-385.
47. Annabi B, Doumit J, Plouffe K, Laflamme C, Lord-Dufour S, Béliveau R. Members of the low-density lipoprotein receptor-related proteins provide a differential molecular signature between parental and CD133+ DAOY medulloblastoma cells. *Mol Carcinog*. 2010;49:710-717.
48. Weiswald LB, Richon S, Validire P, et al. Newly characterised ex vivo colospheres as a three-dimensional colon cancer cell model of tumour aggressiveness. *Br J Cancer*. 2009;101:473-482.
49. Zhang D, Ma QY, Hu HT, Zhang M. beta2-adrenergic antagonists suppress pancreatic cancer cell invasion by inhibiting CREB, NFkappaB and AP-1. *Cancer Biol Ther*. 10 In press 2010.

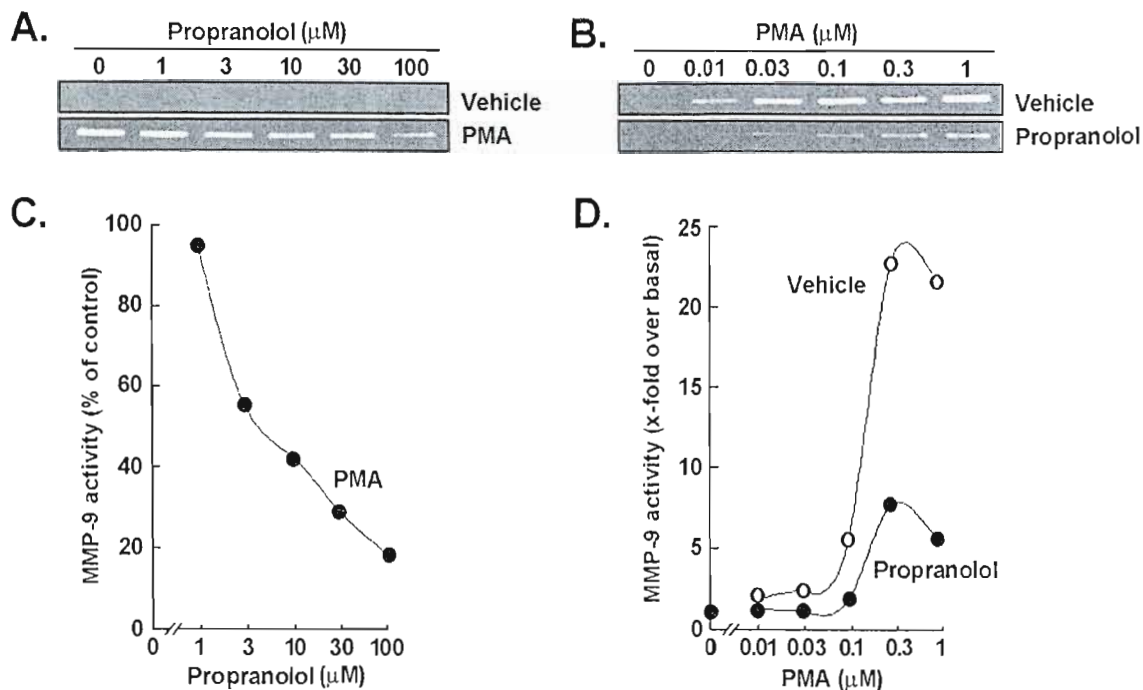
50. Romana-Souza B, Santos JS, Monte-Alto-Costa A. beta-1 and beta-2, but not alpha-1 and alpha-2, adrenoceptor blockade delays rat cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen.* 2009;17:230-239.





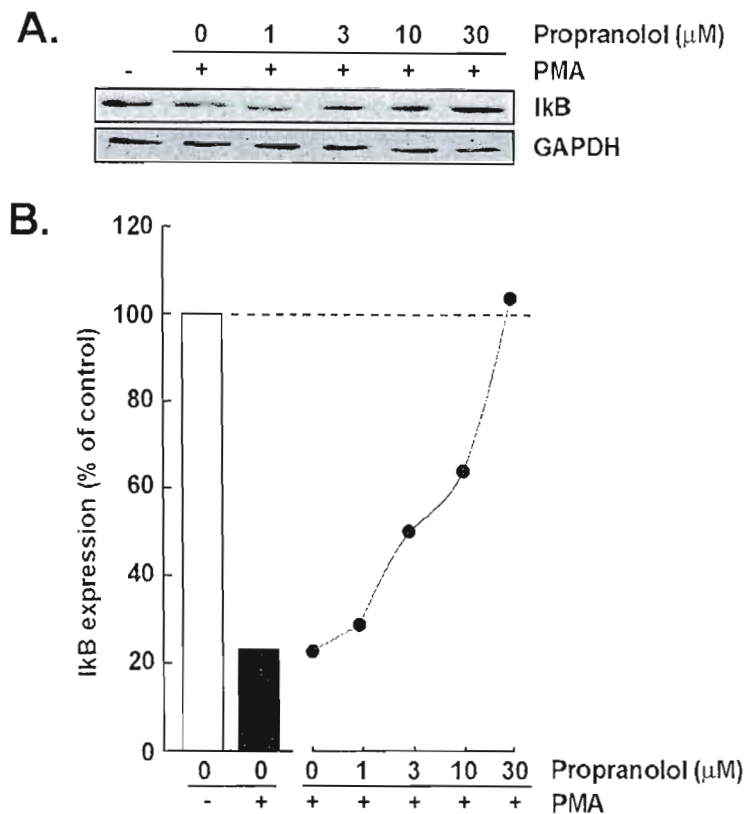
**Fig. 1: Gene expression analysis of  $\beta$ -adrenergic receptor expression in DAOY medulloblastoma cells.** Total RNA was extracted from medulloblastoma-derived DAOY cells and semi-quantitative RT-PCR performed as described in the Methods section. cDNA amplicons were resolved on an agarose gel in order to confirm a single amplification product.

**Abbreviation:** PPIA, peptidylprolyl isomerase A.



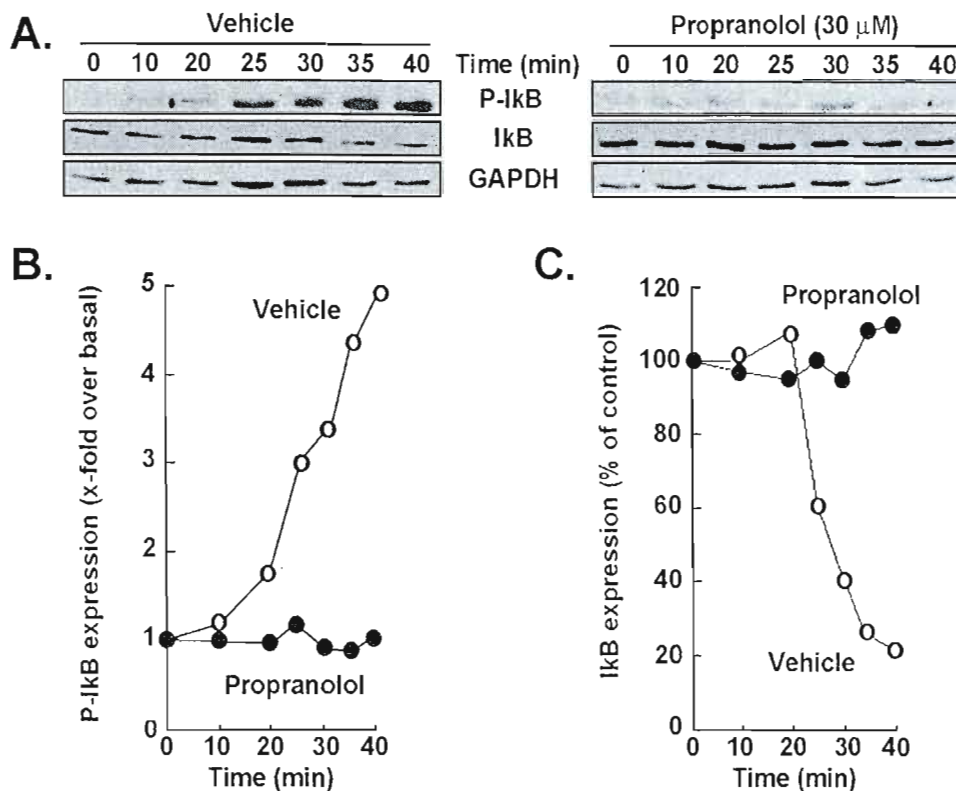
**Figure 2: Propranolol inhibits PMA-induced matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) secretion in DAOY medulloblastoma cells.** Medulloblastoma-derived DAOY cells were serum-starved in the presence of various concentrations of propranolol in combination with vehicle or 1  $\mu\text{M}$  PMA for 18 hours (A), or in the presence of various concentrations of PMA in combination with vehicle or 30  $\mu\text{M}$  propranolol for 18 hours (B). Scanning densitometry was used to quantify the extent of proMMP-9 gelatinolytic activity for each set of data (C, D). Data shown is representative of two independent experiments.

**Abbreviation:** PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate.



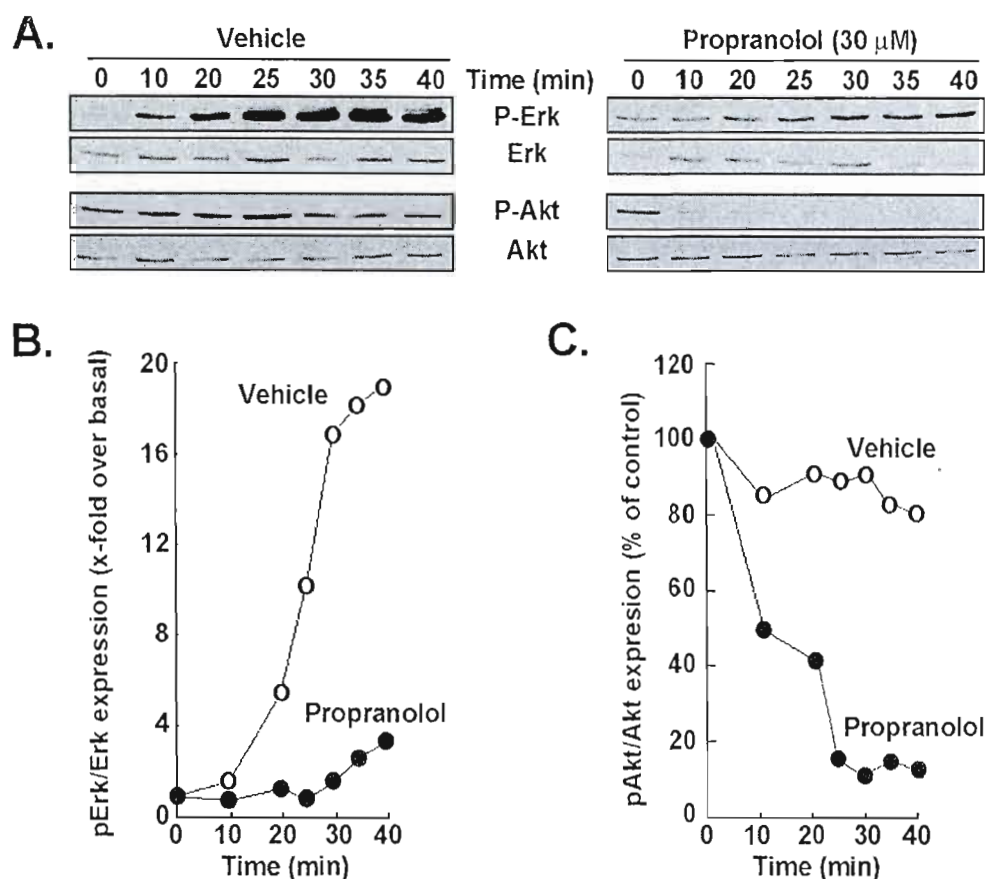
**Figure 3: Propranolol reverses PMA-mediated I $\kappa$ B degradation.** Medulloblastoma-derived DAOY cells were serum-starved in the presence of various concentrations of propranolol in combination with vehicle or 1  $\mu$ M PMA for 18 hours. **A)** Lysates were isolated, electrophoresed via sodium dodecylsulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and immunodetection of I $\kappa$ B and GAPDH proteins was performed as described in the Methods section. **B)** Quantification was performed by scanning densitometry of the autoradiograms. Data were expressed as the percent (%) expression of untreated basal conditions. Data shown is representative of two independent experiments.

**Abbreviation:** PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate.



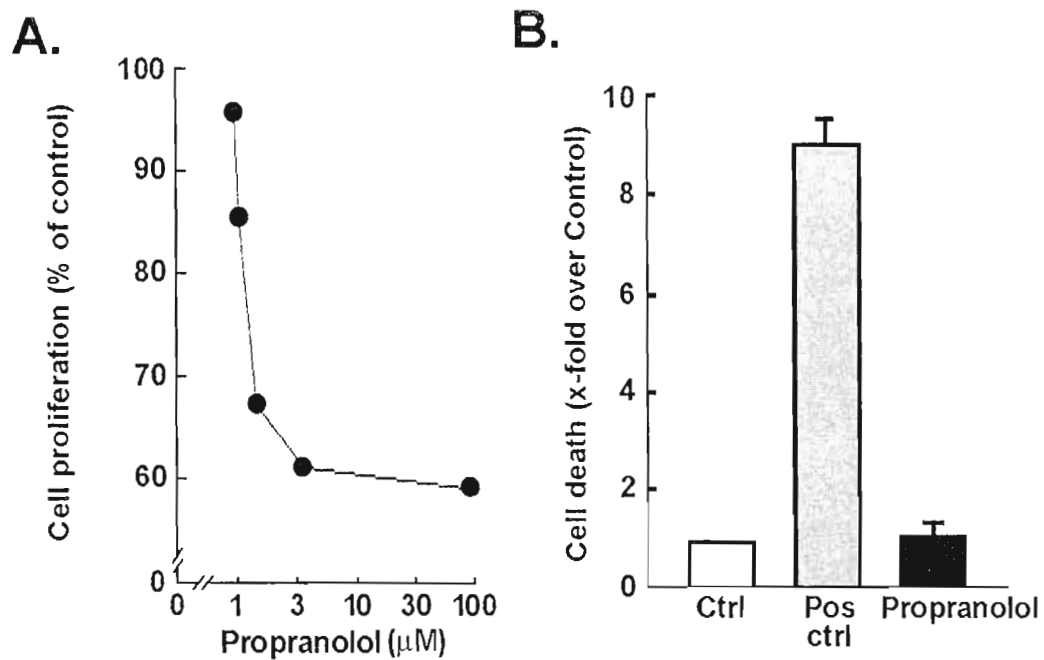
**Figure 4: Propranolol inhibits PMA-induced IkB phosphorylation that leads to IkB degradation.** A) Medulloblastoma-derived DAOY cells were serum-starved for 30 minutes in the presence of vehicle or 30  $\mu$ M propranolol. Cells were then incubated for the indicated time with 1  $\mu$ M PMA. Lysates were isolated, proteins electrophoresed via sodium dodecylsulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and immunodetection of phosphorylated IkB (P-IkB), IkB, and of GAPDH proteins was performed as described in the Methods section. B, C) Quantification was performed by scanning densitometry of the autoradiograms. Data were expressed as x-fold induction over basal untreated cells for P-IkB, and as the percent (%) expression of untreated basal conditions for IkB. Open circles represent ethanol (vehicle) stimulation, while closed circles represent stimulation by propranolol dissolved in ethanol at 30  $\mu$ M. Data shown is representative of two independent experiments.

**Abbreviation:** PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate.



**Figure 5: Propranolol inhibits PMA-induced phosphorylation of Erk, and potentiates PMA-mediated Akt phosphorylation.** A) Medulloblastoma-derived DAOY cells were serum-starved for 30 minutes in the presence of vehicle or 30  $\mu$ M propranolol. Cells were then incubated for the indicated time with vehicle or 1  $\mu$ M PMA. Lysates were isolated, proteins electrophoresed via sodium dodecylsulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and immunodetection of phosphorylated Erk (P-Erk), Erk, phosphorylated Akt (P-Akt), and of Akt proteins was performed as described in the Methods section. B, C) Quantification was performed by scanning densitometry of the autoradiograms. Data were expressed as x-fold induction over basal untreated cells for P-Erk/Erk, and as the percent (%) expression of untreated basal conditions for P-Akt/Akt. Open circles represent ethanol (vehicle) stimulation, while closed circles represent stimulation by propranolol dissolved in ethanol at 30  $\mu$ M. Data shown is representative of two independent experiments.

**Abbreviation:** PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate.



**Figure 6 : Propranolol inhibits PMA-induced cell proliferation but not cell survival.** **A)** Medulloblastoma-derived DAOY cells were treated as described in Figure 2 and left to grow for 48 hours in presence of various propranolol concentrations. Cell proliferation assay was performed as described in the Methods section. **B)** Cell death was assessed through the release of LDH into the conditioned media and assessed as described in the Methods section of serum-starved DAOY cells treated with ethanol, the vehicle (white bar), 50  $\mu$ M etoposide (grey bar), or 100  $\mu$ M propranolol (black bar). Data shown is representative of two independent experiments.

**Abbreviation:** PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate.

## **2. Anti-inflammatory assessment of lupeol within procarcinogenic stimulation reveals MT1-MMP requirement in DAOY medulloblastoma cells**

Eric Vaillancourt-Jean<sup>1</sup>, Borhane Annabi<sup>1</sup> and Richard Béliveau<sup>2</sup>

*<sup>1</sup>Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie, Centre de Recherche BioMED, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada, <sup>2</sup>Department of Neurosurgery, CHUM-UQAM, Montreal, Québec, Canada*

### **Contributions des auteurs :**

**E. Vaillancourt-Jean :** Expérimentation, analyse des résultats, montage des figures et rédaction du manuscrit.

**B. Annabi :** Conception du projet, analyse des résultats, montage des figures et rédaction du manuscrit.

**R. Béliveau :** Financement et conception du projet.

Article soumis dans le journal scientifique *Inflammopharmacology*

---

# **Anti-inflammatory assessment of lupeol within procarcinogenic stimulation reveals MT1-MMP requirement in DAOY medulloblastoma cells**

Eric Vaillancourt-Jean<sup>1¶</sup>, Borhane Annabi<sup>1¶</sup>, and Richard Béliveau<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>*Laboratoire d'Oncologie Moléculaire and* <sup>2</sup>*Laboratoire de Médecine Moléculaire, Centre de Recherche BioMED, Université du Québec à Montréal, Quebec, Canada*

¶ These authors contributed equally to this work

\* To whom correspondence and reprint requests should be directed

Laboratoire de Médecine Moléculaire  
Université du Québec à Montréal  
C.P. 8888, Succ. Centre-ville  
Montréal, Québec  
CANADA  
H3C 3P8  
Phone : (514) 987-3000 ext 8551  
Fax : (514) 987-0246  
E-mail : beliveau.richard@uqam.ca

*Key words* : Medulloblastoma, MMP-9, MT1-MMP, NF-κB, COX-2, lupeol

*Short title* : Lupeol regulates MMP-9 and COX-2 expression

*The abbreviations used are* : COX, cyclooxygenase; IL, interleukin; MMP, matrix metalloproteinase; MT1-MMP, membrane type-1 MMP; NF-κB, nuclear factor kappa B; PMA, phorbol-12-myristate 13-acetate; PGE, prostaglandin E



### Abstract

Local inflammation-induced extracellular matrix structural changes are a prerequisite to neoplastic invasion by adult and pediatric intracranial tumours. Accordingly, increased expression of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9, two inflammation-induced MMPs, may further aid the transformed cells either to infiltrate adjacent tissues or to enter the peripheral circulation. In the context of neuroinflammation, MMP-9 has been linked to processes such as blood-brain barrier opening and invasion of neural tissue by blood-derived immune cells. Given its reported combined anti-inflammatory and anti-cancer properties, we investigated the effects of lupeol, a diet-derived triterpenoid, on MMP-9 and cyclooxygenase (COX)-2 expressions in a pediatric medulloblastoma DAOY cell line. Lupeol was unable to inhibit the increased MMP-9 and COX-2 expression in phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-treated cells, but was rather found to synergize with PMA to induce both biomarkers' expression. A contribution of membrane-type 1 MMP (MT1-MMP) was also revealed, since increasing lupeol/PMA treatment triggered proMMP-2 activation, and that MT1-MMP gene silencing reversed the combined effects of lupeol/PMA on MMP-9 and COX-2. The mRNA stabilizing factor HuR was also found increased in the combined lupeol/PMA treatment, potentially suggesting stabilization processes of the MMP-9 and COX-2 transcripts. These evidences add-up to the new pleiotropic molecular mechanisms of action of MT1-MMP that would contribute to lupeol's modulation of inflammatory property and which ultimately may impact on its therapeutic efficacy within procarcinogenic conditions.

## Introduction

The strong association assumed between inflammation and tumor progression has raised interest in the anti-inflammatory and chemopreventive properties of dietary phytochemicals (Béliveau and Gingras 2007; Wang 2011). Accordingly, lupeol, a phytosterol and triterpene widely found in edible fruits and vegetables has been ascribed pleiotropic pharmacological activities that include anti-inflammatory, anti-microbial, anti-protozoal, anti-proliferative, anti-invasive, and anti-angiogenic capacity (Moreau et al. 2002; Saleem 2009). Evidence has also been provided that lupeol modulates the expression or activity of several contributors to inflammation such as cytokines IL2, IL4, IL5, IL $\beta$ , proteases,  $\alpha$ -glucosidase, cFLIP, Bcl-2 and NF $\kappa$ B (Siddique and Saleem 2011). Given the complexity of carcinogenic processes and the fact that microenvironment dictates the acquisition of a tumour invasive and inflammatory phenotype, the wide spectrum of molecular mechanisms of action that characterize the intrinsic activity of lupeol may possibly be envisioned in the development of optimized therapeutic modalities. The specific combined anti-inflammatory and chemopreventive activities of lupeol within procarcinogenic conditions have however been poorly investigated.

Medulloblastoma is the most common and one of the most deadly malignant brain tumors of infancy (Packer 2007; Kanu et al. 2009). In addition to high tumor resistance to ionizing radiation and to chemotherapy, proximity of medulloblastomas to cerebrospinal fluid greatly enhances metastasis rate in the central nervous system (Bao et al. 2006; Mazloom et al. 2010). As part of our continuous effort to understand the molecular links between inflammation and tumourigenesis, we recently demonstrated that tumour

---

microenvironment dictated the acquisition of an invasive phenotype in medulloblastoma cancer stem cells (Annabi et al. 2008a). Such phenotype was in part linked to increased expression of MMP-9 and MT1-MMP, two MMPs involved in angiogenesis as well as cancer cell migration and metastasis (Chambers and Matrisian 1997; Amalinei et al. 2010). More importantly, a fundamental new role of MT1-MMP, besides its classical role in proMMP-2 activation, was later demonstrated in intracellular signal transduction through its cytoplasmic domain, such as bioactive lipophospholipid signaling (Annabi et al. 2009a), NF- $\kappa$ B-mediated cyclooxygenase (COX)-2 regulation (Han et al. 2001; Annabi et al. 2009b; Sina et al. 2010), and as a cell death sensor/effector (Belkaid et al. 2007; Currie et al. 2007; Proulx-Bonneau et al. 2011). Furthermore, while involvement of COX-2/PGE<sub>2</sub> pathway in the upregulation of MMP-9 was demonstrated in pancreatic cancer (Bu et al., 2011), specific pharmacological targeting of NF- $\kappa$ B was found to efficiently downregulate carcinogen-induced MMP-9 and COX-2 expression in brain endothelial cell as well as in medulloblastoma cell models (Annabi et al. 2010; Tahanian et al. 2011).

Using a pediatric medulloblastoma-derived DAOY cell line model, we now assessed lupeol's multi-targeted capacity to temper procarcinogenic stimulation, as induced upon phorbol 12-myristate 13-acetate-activated (PMA) treatment, on MMP-9 secretion and COX-2 expression. MT1-MMP contribution was also evaluated in the pathways modulated by the concerted action of lupeol/PMA. Also, since MMP-9 gene expression wouldn't account for the increased enzyme activity reported by joint lupeol/PMA treatment, transcript stabilization by HuR scaffold protein was investigated.

---

## Material and Methods

*Materials* : Sodium dodecylsulfate (SDS) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma (Oakville, ON). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Perkin Elmer (Waltham, MA). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). Lupeol was from Extrasynthese (Lyon, France). The polyclonal antibody against MT1-MMP (AB815) was from Chemicon (Temecula, CA). The polyclonal antibody against I $\kappa$ B was purchased from Cell Signaling (Danvers, MA). The polyclonal antibody against HuR was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The polyclonal antibody against COX-2 and monoclonal antibody against GAPDH were from Advanced Immunochemical Inc. (Long Beach, CA). Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse IgG secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). All other reagents were from Sigma-Aldrich Canada.

*Cell culture* : The human DAOY medulloblastoma cell line was purchased from American Type Culture Collection and was maintained in Eagle's Minimum Essential Medium containing 10% (v/v) calf serum (HyClone Laboratories, Logan, UT), 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin. Cells were incubated at 37°C, with 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. Treatment was done in X-Vivo 15 from Lonza (Walkersville, MD) containing 20 ng/mL of basic fibroblast growth factor, 20 ng/mL of epidermal growth factor from Wisent (St-Bruno, QC), 20 ng/mL of leukemia-inhibitory factor from Sigma-Aldrich Canada and neural survival factor-1 also from Lonza.

*cDNA synthesis and real-time quantitative RT-PCR* : Total RNA was extracted from DAOY-derived cell monolayers using TriZol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD). For cDNA synthesis, 2 µg of total RNA were reverse-transcribed using a high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). cDNA was stored at -80°C prior to PCR. Gene expression was quantified by real-time quantitative PCR using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA). DNA amplification was carried out using an Icyler iQ5 (Bio-Rad), and product detection was performed by measuring binding of the fluorescent dye SYBR Green I to double-stranded DNA. GAPDH primer sets were synthesized by Biocorp (Dollard-des-Ormeaux, QC) with the following sequences: forward CCATCA-CCATCTTCCAGGAG and reverse CCTGCTTCACCACCTTCTTG. The following QuantiTect primer sets were provided by Qiagen (Valencia, CA) : MMP-9 (QT00040040), COX-2 (QT00040586), MT1-MMP (QT00001533), HuR (QT00001533), and β-Actin (QT01136772). The relative quantities of target gene mRNA compared against two internal controls, GAPDH and β-Actin mRNA, were measured by following a  $\Delta C_T$  method employing an amplification plot (fluorescence signal vs cycle number). The difference ( $\Delta C_T$ ) between the mean values in the triplicate samples of target gene and those of GAPDH and β-actin mRNAs were calculated by iQ5 Optical System Software (v 2.0; Bio-Rad), and the relative quantified value was expressed as  $2^{-\Delta C_T}$ .

*Transfection method and RNA interference*: Cells were transiently transfected with 20 nM siRNA (Qiagen) against MT1-MMP (Hs\_MMP14\_6 FlexiTube siRNA, SI03648841) or scrambled sequences (AllStar Negative Control siRNA, 1027281) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, ON). Specific gene

knockdown was evaluated by qRT-PCR as described above. Small interfering RNA and mismatch siRNA were synthesized by Qiagen (Valencia, CA) and annealed to form duplexes.

*Gelatin zymography* : Gelatin zymography was used to assess the extent of proMMP-9 activity as previously described (Belkaid et al. 2007). Briefly, an aliquot (20  $\mu$ l) of the culture medium was subjected to SDS-PAGE in a gel containing 0.1 mg/ml gelatin. The gels were then incubated in 2.5% Triton X-100 and rinsed in nanopure distilled H<sub>2</sub>O. Gels were further incubated at 37°C for 20 hrs in 20 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% Brij-35, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6, then stained with 0.1% Coomassie Brilliant blue R-250 and destained in 10% acetic acid, 30% methanol in H<sub>2</sub>O. Gelatinolytic activity was detected as unstained bands on a blue background.

*Immunoblotting procedures* : Proteins from control and treated cells were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). After electrophoresis, proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes which were then blocked for 1 hr at room temperature with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) containing 0.3% Tween-20 (TBST). Membranes were further washed in TBST and incubated with the primary antibodies (1/1,000 dilution) in TBST containing 3% bovine serum albumin, followed by a 1 hr incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG (1/2,500 dilution) in TBST containing 5% non-fat dry milk. Immunoreactive material was visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC).

---

## Results

*COX-2 expression is increased upon lupeol/PMA synergistic actions through an NF- $\kappa$ B signalling pathway.* We first assessed lupeol's actions within a procarcinogenic environment. This was generated by the use of 1  $\mu$ M PMA stimulation of serum-starved medulloblastoma-derived DAOY cells in the presence of various concentrations of lupeol for 18 hours. As expected, we found that COX-2 expression was significantly increased upon PMA treatment (Fig.1A, upper panel), and this required NF- $\kappa$ B signalling since I $\kappa$ B levels decreased (Fig.1A, middle panel). Unexpectedly, when increasing concentrations of lupeol were concomitantly added, COX-2 levels further synergistically increased inversely correlating with a parallel decrease in I $\kappa$ B expression (Fig.1B). These results are new unreported effects of lupeol within procarcinogenic culture conditions.

*Concomittant proMMP-9 secretion and proMMP-2 activation are increased upon synergistic actions of lupeol/PMA.* PMA is also well documented to induce MMPs secretion and/or activation processes (Ou et al. 2011; Tahanian et al. 2011). We therefore harvested the conditioned media from above described conditions and used zymography to monitor both MMP-9 and MMP-2 gelatinolytic activities (Fig.2A). We found that PMA alone significantly induced proMMP-9 secretion (Fig.2B) and partially triggered latent proMMP-2 processing into active MMP-2 (Fig.2C). Again, addition of increasing concentrations of lupeol in the presence of PMA not only potentiated proMMP-9 secretion, but further triggered proMMP-2 activation. Collectively, this data adds up to the pleiotropic targets of joint lupeol/PMA treatments, and further highlights potential new mechanisms possibly

involving MT1-MMP in proMMP-2 activation and some mechanisms supporting proMMP-9 expression.

*The synergistic lupeol/PMA effects require MT1-MMP.* MT1-MMP signaling axis involved in inflammation have been reported both directly (Sakamoto and Seiki 2009; Sina et al. 2010) and indirectly (Annabi et al. 2009b; Paquette et al. 2011). Here, in order to assess the joint contribution of lupeol/PMA treatment on COX-2 expression we used gene silencing strategies and transiently transfected DAOY cells with either scrambled (siScrambled) or MT1-MMP (siMT1-MMP) specific siRNA. Subsequent treatments were performed with lupeol, PMA, or lupeol/PMA as described above. MT1-MMP knockdown was confirmed at the protein level (Fig.3A, upper panel). Consequently, the observed increases in COX-2 (Fig.3B) and in MMP-9 (Fig.3D) levels upon PMA or lupeol/PMA were all reduced without affecting GAPDH expression. Interestingly, significant reversal in the decrease of I $\kappa$ B expression induced by PMA was observed when MT1-MMP was depleted (Fig.3C) in agreement with the MT1-MMP/NF- $\kappa$ B signaling axis previously reported (Annabi et al. 2009b). In addition to the MT1-MMP contribution in the synergistic action of lupeol/PMA on COX-2 and MMP-9, we also found that increased expression of HuR was revealed upon lupeol/PMA treatment (Fig.3E) supporting a potential contribution in 3'-UTR stabilization of MMP-9 mRNA (Annabi et al. 2008b; Annabi et al. 2007). Whether any transcriptional regulation of COX-2, MMP-9 and of HuR occurs upon lupeol/PMA was next investigated.



*MT1-MMP is required for the transcriptional regulation of COX-2 and MMP-9 upon synergistic actions of lupeol and PMA.* Total RNA was extracted from the above siScrambled- or siMT1-MMP-transfected and treated DAOY cells. RT-PCR followed by qPCR enabled to assess transcriptional regulation of COX-2, MMP-9, and of HuR as described in the Methods section. Efficient MT1-MMP gene silencing was confirmed and small induction by PMA or lupeol/PMA observed (Fig.4A) confirming the slight proMMP-2 activation previously observed by zymography. COX-2 gene expression was also induced by PMA and potentiated by lupeol/PMA treatment (Fig.4B). MT1-MMP gene silencing, however, did not significantly downregulate PMA-induced or lupeol/PMA-induced COX-2 gene expression. In contrast, MMP-9 gene expression was also induced by PMA or lupeol/PMA, but MT1-MMP gene silencing resulted in decreased MMP-9 gene expression (Fig.4C). When HuR gene expression levels were assessed, they remained relatively unchanged independent of the treatment (Fig.4D). Collectively, we provide evidence for some post-transcriptional events that would regulate MT1-MMP-mediated regulation of HuR that would, in turn, regulate MMP-9 transcript stabilization leading to increased MMP-9 expression in lupeol/PMA-treated cells.

## Discussion

Therapeutic efficiency of lupeol have been reported against inflammation-associated conditions that characterize wound healing, diabetes, cardiovascular disease, kidney disease, and arthritis (Geetha and Varalakshmi 1999; Sudhahar et al. 2006; Sudhahar et al. 2007; Papi Reddy et al. 2009). Accordingly, various *in vitro* and *in vivo* models have also suggested lupeol to be pharmacologically effective both as an anti-inflammatory and anti-cancer agent (Saleem 2009). Some of lupeol's anti-inflammatory properties arise, in fact, from its capacity to abrogate synthesis of pro-inflammatory mediators (Fernandez et al. 2001), and to modulate several cancer-associated signalling pathways such as NF- $\kappa$ B, MAPK, Ras, Wnt and PI3K/Akt (Saleem et al. 2004; Saleem et al. 2005; Tarapore et al. 2010). While the sum of the multi-targeted effects of such a pharmacological agent is expected to impact on a variety of intracellular biomarkers expression, its intrinsic mechanism of action however remains poorly documented within procarcinogenic conditions.

In this study, we highlight an unexpected mechanism of action of lupeol in synergy with procarcinogenic signalling such as one would expect within the tumour microenvironment. Induction of COX-2, one of the most preeminent mediators of inflammation in pathologic conditions, upon lupeol/PMA treatment is shown to require a crucial MT1-MMP-mediated intracellular signaling axis which silencing antagonized MMP-9 and COX-2 expression. Though a clear picture of its intrinsic mechanism has yet to emerge, phosphorylation of Tyr<sup>573</sup> on MT1-MMP's cytosolic tail by a member of the Src kinase family is highly suspected as part of the signal transduction mechanism (Nyalendo et

al., 2007). Such contribution of MT1-MMP has been reported elsewhere and include a role in PGE<sub>2</sub>-induced angiogenesis (Alfranca et al. 2008), platelet-mediated calcium mobilization (Fortier et al. 2008a), regulation of cell death/survival bioswitch (Belkaid et al. 2007; Fortier et al. 2008b), and radioresistance in both glioma cells (Wild-Bode et al. 2001; Wick et al. 2002) and endothelial cells (Annabi et al. 2003). Finally, the recent demonstration that MT1-MMP also plays a role in medulloblastoma CD133(+) neurosphere-like formation and increased invasiveness (Annabi et al. 2009b) reinforces the concept to rather assess the pharmacological properties of anti-inflammatory agents on alternate pathways, such as for instance in their capacity to directly target MT1-MMP's associated signaling functions in inflammation. Recent COX inhibitors, for instance, have been shown to rather directly alter gene and protein expression of specific targets involved in tumorigenesis and inflammation (Wang et al. 2011).

Pharmacological targeting of NF- $\kappa$ B-mediated MMP-9 expression was recently reported by us in medulloblastoma-derived cells and in human brain microvascular endothelial cells (Annabi et al. 2010; Annabi et al. 2008b; Annabi et al. 2009c). In the current study, we demonstrate that MT1-MMP-mediated signaling also contributes to the mRNA regulation of MMP-9 expression following lupeol/PMA stimulation, and that this possibly occurs through stabilization of the 3'UTR site of the transcript by the ELAV-like protein HuR. Insufficient HuR-mediated transcript stabilization may ultimately result in the rapid degradation of the MMP-9 transcript (Fan and Steitz 1998). Moreover, it should be acquainted that HuR synthesis is, in part, regulated by NF- $\kappa$ B signaling (Kang et al., 2008), further supporting that its downregulated expression upon silencing of the MT1-MMP axis is once again potentially dependent of this signaling network. As HuR protein levels

remained unaffected by lupeol treatment in MT1-MMP knockout conditions, this further confirms that NF- $\kappa$ B-dependant modulation by lupeol is possibly impaired. Also, it should be acquainted that, though HuR gene expression is not modulated by PMA or lupeol treatment, proteins levels of HuR were found to be elevated suggesting that stabilization resulting in slower degradation of the scaffold protein might occur. This however remains to be investigated.

In conclusion, this study is among the first investigation of lupeol's mechanism of action under procarcinogenic stimulation. Aside from apparent protection from superoxide generation in human neutrophils (Yamashita et al., 2002), we provide new evidence that several alternative signaling pathways might be involved in the regulation of inflammatory biomarkers gene expression such as MMP-2, MMP-9 and COX-2. Intracellular signaling mediated by MT1-MMP, possibly through its intracellular cytoplasmic domain, will remain to be further investigated but seems to play a key role in lupeol's effects under procarcinogenic conditions. Whether similar mechanisms are also involved in the actions of other dietary phytochemicals is currently unknown. Based on our results, increased understanding of neoplastic adaptative mechanisms and design of therapeutic strategies based on targeting microenvironment-mediated chronic inflammation and angiogenesis will be required.

### Acknowledgments

BA holds a Canada Research Chair in Molecular and Metabolic Oncology from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). RB holds an Institutional UQAM Research Chair in Cancer Prevention and Treatment. This study was funded by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to RB.

## References

Alfranca A, López-Oliva JM, Genís L, et al (2008) PGE2 induces angiogenesis via MT1-MMP-mediated activation of the TGFbeta/Alk5 signaling pathway. *Blood* 112:1120-1128

Amalinei C, Caruntu ID, Giusca SE, et al (2010) Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Rom J Morphol Embryol* 51:215-228

Annabi B, Lee YT, Martel C, et al (2003) Radiation induced-tubulogenesis in endothelial cells is antagonized by the antiangiogenic properties of green tea polyphenol (-) epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Biol Ther* 2:642-649

Annabi B, Rojas-Sutterlin S, Laflamme C, et al (2008a) Tumor environment dictates medulloblastoma cancer stem cell expression and invasive phenotype. *Mol Cancer Res* 6:907-916

Annabi B, Rojas-Sutterlin S, Laroche et al (2008b) The diet-derived sulforaphane inhibits matrix metalloproteinase-9-activated human brain microvascular endothelial cell migration and tubulogenesis. *Mol Nutr Food Res* 52:692-700

Annabi B, Lachambre MP, Plouffe K, et al (2009a) Modulation of invasive properties of CD133+ glioblastoma stem cells: a role for MT1-MMP in bioactive lysophospholipid signaling. *Mol Carcinog* 48:910-919

Annabi B, Laflamme C, Sina A, et al (2009b) A MT1-MMP/NF-kappaB signaling axis as a checkpoint controller of COX-2 expression in CD133+ U87 glioblastoma cells. *J Neuroinflammation* 6:8

Annabi B, Lachambre MP, Plouffe K, et al (2009c) Propranolol adrenergic blockade inhibits human brain endothelial cells tubulogenesis and matrix metalloproteinase-9 secretion. *Pharmacol Res* 60:438-445

Annabi B, Vaillancourt-Jean E, Weil AG, et al (2010) Pharmacological targeting of beta-adrenergic receptor functions abrogates NF-kappaB signaling and MMP-9 secretion in medulloblastoma cells. *Onco Targets Ther* 3:219-226

Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. (2006) Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444:756-760

Belkaid A, Fortier S, Cao J, et al (2007) Necrosis induction in glioblastoma cells reveals a new "bioswitch" function for the MT1-MMP/G6PT signaling axis in proMMP-2 activation versus cell death decision. *Neoplasia* 9:332-340

Béliveau R, Gingras D. (2007) Role of nutrition in preventing cancer. *Can Fam Physician* 53:1905-1911

Bu X, Zhao C, Dai X. (2011) Involvement of COX-2/PGE(2) Pathway in the Upregulation of MMP-9 Expression in Pancreatic Cancer. *Gastroenterol Res Pract.* (in press)

Chambers AF, Matrisian LM. (1997) Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 89:1260-1270

Currie JC, Fortier S, Sina A, et al. (2007) MT1-MMP down-regulates the glucose 6-phosphate transporter expression in marrow stromal cells: a molecular link between pro-MMP-2 activation, chemotaxis, and cell survival. *J Biol Chem.* 282:8142-8149

Fan XC, Steitz JA. (1998) Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *Embo J* 17:3448-3460

Fernandez MA, de las Heras B, Garcia MD, et al. (2001) A. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 53:1533-1539

Fortier S, Labelle D, Sina A, et al. (2008a) Silencing of the MT1-MMP/ G6PT axis suppresses calcium mobilization by sphingosine-1-phosphate in glioblastoma cells. *FEBS Lett* 582:799-804

Fortier S, Touaibia M, Lord-Dufour S, et al. (2008b) Tetra- and hexavalent mannosides inhibit the pro-apoptotic, antiproliferative and cell surface clustering effects of concanavalin-A: impact on MT1-MMP functions in marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Glycobiology* 18:195-204

Geetha T, Varalakshmi P. (1999) Anticomplement activity of triterpenes from *Crataeva nurvala* stem bark in adjuvant arthritis in rats. *Gen Pharmacol* 32:495-497

Han YP, Tuan TL, Wu H, et al. TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP. *J Cell Sci.* 114:131-139

Kang MJ, Ryu BK, Lee MG, et al. NF-kappaB activates transcription of the RNA-binding factor HuR, via PI3K-AKT signaling, to promote gastric tumorigenesis. *Gastroenterology* 135:2030-2042

Kanu OO, Mehta A, Di C, et al. (2009) Glioblastoma multiforme: a review of therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets* 13:701-718

Mazloom A, Zangeneh AH, Paulino AC. (2010) Prognostic factors after extraneural metastasis of medulloblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 78:72-78

Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB. (2002) Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog Lipid Res* 41:457-500

Nyalendo C, Michaud M, Beaulieu E, Roghi C, Murphy G, Gingras D, Béliveau R. (2007) Src-dependent phosphorylation of membrane type I matrix metalloproteinase on



cytoplasmic tyrosine 573: role in endothelial and tumor cell migration. *J Biol Chem* 282(21):15690-9.

Ou Y, Li W, Li X, et al (2011) Sinomenine reduces invasion and migration ability in fibroblast-like synoviocytes cells co-cultured with activated human monocytic THP-1 cells by inhibiting the expression of MMP-2, MMP-9, CD147. *Rheumatol Int* 31:1479-1485

Packer RJ. (2007) Craniospinal radiation therapy followed by adjuvant chemotherapy for newly diagnosed average-risk medulloblastoma. *Curr Neurol Neurosci Rep* 7:130-132

Papi Reddy K, Singh AB, Puri A, et al (2009) Srivastava, A. K. & Narender, T. Synthesis of novel triterpenoid (lupeol) derivatives and their in vivo antihyperglycemic and antidyslipidemic activity. *Bioorg Med Chem Lett* 19:4463-4466

Proulx-Bonneau S, Pratt J, Annabi B. (2011) A role for MT1-MMP as a cell death sensor/effector through the regulation of endoplasmic reticulum stress in U87 glioblastoma cells. *J Neurooncol.* 104:33-43

Saleem M, Afaq F, Adhami VM, et al (2004) Lupeol modulates NF-kappaB and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. *Oncogene* 23:5203-5214

Saleem M, Kaur S, Kweon MH, et al (2005) Lupeol, a fruit and vegetable based triterpene, induces apoptotic death of human pancreatic adenocarcinoma cells via inhibition of Ras signaling pathway. *Carcinogenesis* 26:1956-1964

Saleem M. (2009) Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer Lett* 285:109-115

Siddique HR, Saleem M. (2011) Beneficial health effects of lupeol triterpene: a review of preclinical studies. *Life Sci* 88:285-293

Sina A, Proulx-Bonneau S, Roy A, et al (2010) The lectin concanavalin-A signals MT1-MMP catalytic independent induction of COX-2 through an IKK $\gamma$ /NF- $\kappa$ B-dependent pathway. *J Cell Commun Signal* 4:31-38

Sudhahar V, Kumar SA, Varalakshmi P. (2006) Role of lupeol and lupeol linoleate on lipemic-oxidative stress in experimental hypercholesterolemia. *Life Sci* 78:1329-1335

Sudhahar V, Kumar SA, Sudharsan PT, et al (2007) Protective effect of lupeol and its ester on cardiac abnormalities in experimental hypercholesterolemia. *Vascul Pharmacol* 46:412-418

Tahanian E, Sanchez LA, Shiao TC, et al (2011) Flavonoids targeting of I $\kappa$ B phosphorylation abrogates carcinogen-induced MMP-9 and COX-2 expression in human brain endothelial cells. *Drug Des Devel Ther.* 5:299-309

Tarapore RS, Siddiqui IA, Saleem M, et al (2010) Specific targeting of Wnt/beta-catenin signaling in human melanoma cells by a dietary triterpene lupeol. *Carcinogenesis* 31:1844-1853

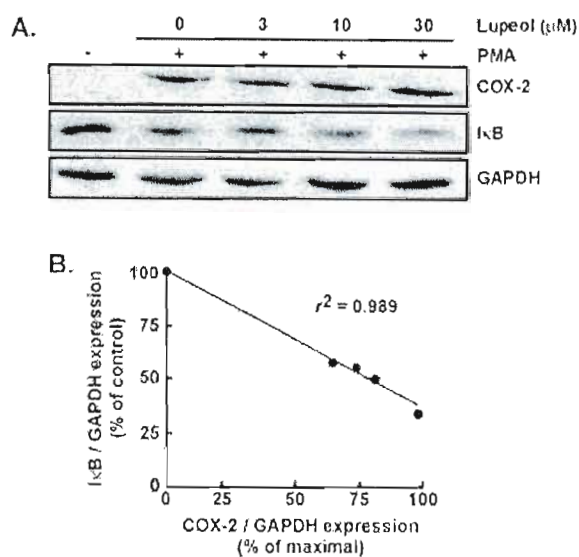
Wang X, Baek SJ, Eling T. (2011) COX inhibitors directly alter gene expression: role in cancer prevention? *Cancer Metastasis Rev* (in press)

Wick W, Wick A, Schulz JB, et al (2002) Prevention of irradiation-induced glioma cell invasion by temozolomide involves caspase 3 activity and cleavage of focal adhesion kinase. *Cancer Res.* 62:1915-1919

Wild-Bode C, Weller M, Rimner A, et al (2001) Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma. *Cancer Res.* 61:2744-2750

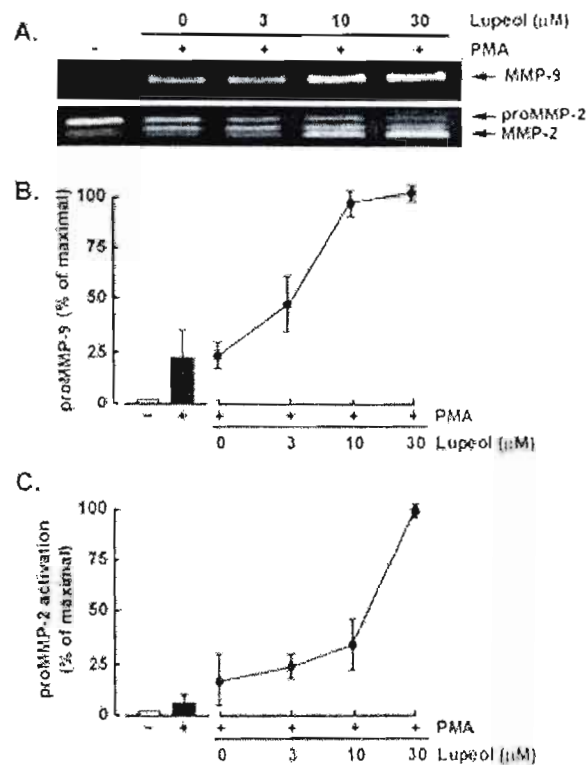
Yamashita K, Lu H, Lu J, et al (2002) Effect of three triterpenoids, lupeol, betulin, and betulinic acid on the stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation of proteins in human neutrophils. *Clin Chim Acta* 325:91-96

Fig.1



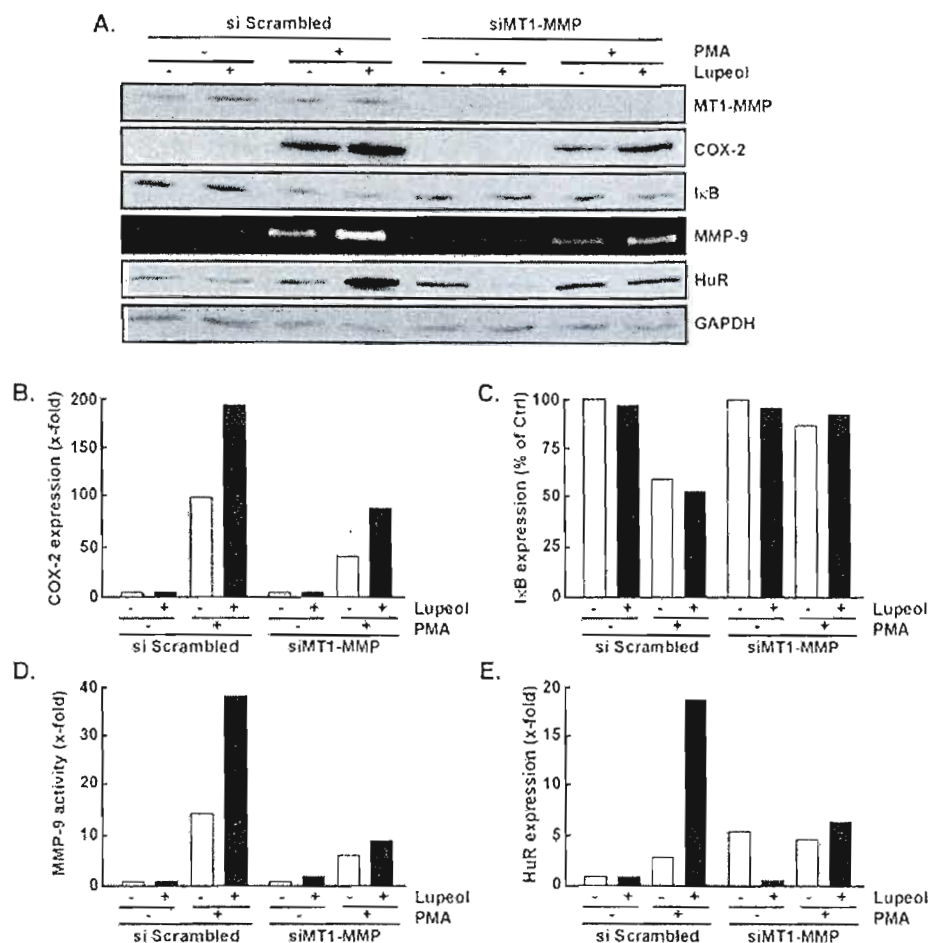
**Figure 1: COX-2 and MMP-9 expression is increased upon synergistic actions of lupeol and PMA.** DAOY cells were serum-starved in the presence of various concentrations of lupeol in combination with vehicle or 1  $\mu$ M PMA for 18 hrs. **(A)** Lysates were isolated, proteins electrophoresed via SDS-PAGE and immunodetection of COX-2, I $\kappa$ B and GAPDH proteins performed as described in the Methods section. **(B)** Quantification was performed by scanning densitometry of the respective autoradiograms, data normalized on GAPDH, and correlation between I $\kappa$ B and COX-2 expression represented. Data shown is representative of two independent experiments.

Fig.2



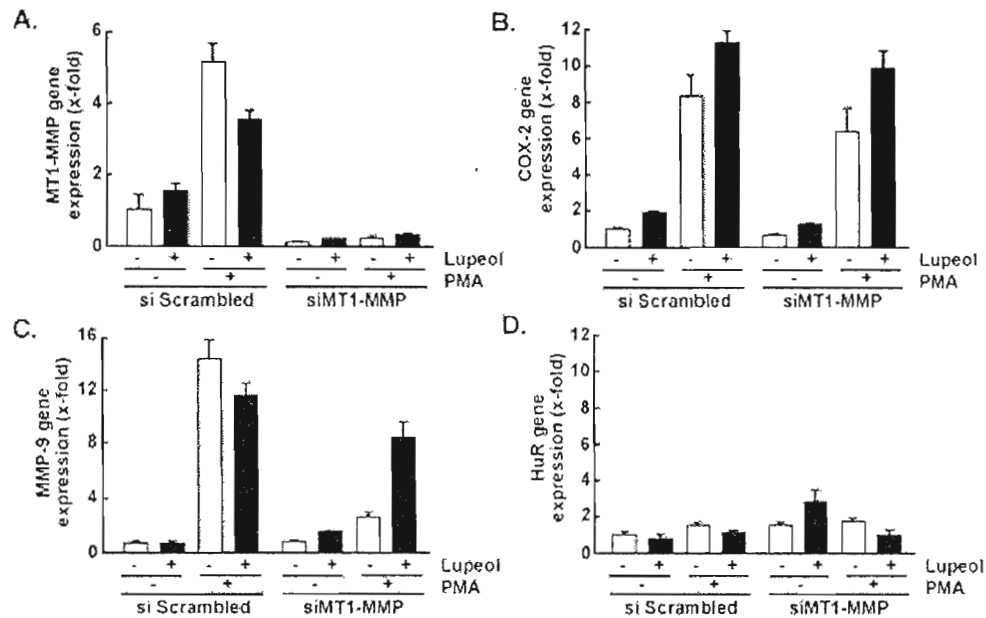
**Figure 2: Concomittant proMMP-9 secretion and proMMP-2 activation are increased upon synergistic actions of lupeol and PMA.** DAOY cells were serum-starved in the presence of various concentrations of lupeol in combination with vehicle or 1 μM PMA for 18 hrs. (A) Gelatin zymography was performed with the respective conditioned media to assess the extent of proMMP-9, proMMP-2, and MMP-2 activities. Scanning densitometry of the zymogram was performed to quantify the extent of proMMP-9 secretion (B), or the extent of proMMP-2 activation (C, MMP-2/proMMP-2). Data shown is representative of two independent experiments.

Fig.3



**Figure 3: The synergistic lupeol/PMA effects require MT1-MMP.** DAOY cells were transfected with scrambled (siScrambled) siRNA sequences or with siMT1-MMP as described in the Methods section. The cells were then serum-starved in the presence of 1  $\mu$ M PMA and/or 30  $\mu$ M lupeol for 18 hrs. (A) Lysates were isolated, proteins electrophoresed via SDS-PAGE and immunodetection performed as described in the Methods section. Gelatin zymography also was used to assess the extent of proMMP-9 secretion in the conditioned media. Scanning densitometry was used to quantify the autoradiograms for (B) COX-2, (C) I $\kappa$ B, (D) proMMP-9, and (E) HuR respective expression. Densitometric values are means of two independent experiments. Data shown is representative of two independent experiments.

Fig.4



**Figure 4: MT1-MMP is required for the transcriptional regulation of COX-2 and MMP-9 upon synergistic actions of lupeol and PMA.** DAOY cells were transfected with scrambled (siScrambled) siRNA sequences or with siMT1-MMP as described in the Methods section. The cells were then serum-starved in the presence of 1  $\mu$ M PMA and/or 30  $\mu$ M lupeol for 18 hrs. Total RNA was extracted and transcribed into cDNA as described in the Methods section. qPCR was then performed in order to assess gene expression levels of MT1-MMP (A), COX-2 (B), MMP-9 (C), and HuR (D). Values are means of two independent experiments assessed in triplicate. Data shown is representative of two independent experiments.

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

Le médulloblastome, l'un des types de cancer cérébral pédiatrique le plus invasif, se distingue par sa résistance aux traitements conventionnels et par son inaccessibilité (Murat *et al.*, 2008 ; Verhoeff *et al.*, 2009). L'importance de cibler les acteurs de la promotion tumorale n'en est que plus opportune, ainsi que l'élucidation des mécanismes moléculaires à leur origine afin d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques plus spécifiques et moins problématiques pour l'hôte. Nos recherches ont ainsi porté sur la caractérisation du potentiel anti-tumoral de deux agents pharmacologiques, soit le propranolol ainsi que le lupeol, sur un modèle de médulloblastome de type DAOY.

L'une des cibles phénotypiques majeures de cette étude est l'état d'inflammation généré au sein du microenvironnement tumoral. Étant un acteur propice à la croissance d'un néoplasme, les conséquences de cet état menant à la promotion du développement tumoral sont relativement bien documentées (Balkwill et Mantovani, 2001 ; Costa *et al.*, 2002 ; Sica, 2010). La voie de signalisation NF- $\kappa$ B joue un rôle important dans la génération de l'inflammation, notamment via la surexpression de COX-2, mais aussi dans l'induction de la MMP-9, un contributeur critique de l'invasion tumorale, de la métastase et de l'angiogénèse (Deryugina et Quigley, 2006). Cette voie, décrite dans la section 3.1.2 de l'introduction, représente donc une cible de choix en raison de la versatilité de ses rôles dans la cancérogénèse. Le ciblage pharmacologique de cette voie fut décrite pour de nombreuses molécules d'origine naturelle, notamment la curcumine, le resvératrol, le sulforaphane ainsi que l'épigallocatechine-3-gallate (Annabi *et al.*, 2002 ; Annabi *et al.*, 2008b ; Gupta *et al.*, 2011). En conséquence, ces molécules possèdent un caractère anti-tumoral associé à l'inhibition de la MMP-9 ou encore de l'état d'inflammation généré par COX-2. À la lumière de ces découvertes, il est donc logique d'élaborer une stratégie thérapeutique anticancéreuse axée sur la régulation négative de la voie NF- $\kappa$ B, dont les molécules responsables proposent une faible toxicité cellulaire d'une part et une efficacité *in vivo* bien documentée d'autre part.

## 1 Les récepteurs $\beta$ -adrénergiques, médiateurs atypiques dans la signalisation du phénotype invasif tumoral

Notre première hypothèse de travail consistait en l'évaluation du potentiel anti-invasif du propranolol, un antagoniste des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, sur notre modèle cellulaire tumoral cérébral, ainsi qu'en la caractérisation de son mécanisme d'action moléculaire. En effet, le rôle de ces récepteurs dans la progression tumorale a été mis en évidence pour la première fois dans un modèle d'hémangiome infantile (Leaute-Labreze *et al.*, 2008). Des études supplémentaires de notre laboratoire ont permis d'expliquer partiellement cette action anti-angiogénique lorsque, d'une part, les fonctions de ces récepteurs étaient surexprimées dans le compartiment vasculaire tumoral et, d'autre part, que leur blocage par le propranolol menait à l'inhibition de la tubulogénèse ainsi que de la migration cellulaire, deux caractéristiques fondamentales à l'angiogénèse (Annabi *et al.*, 2009a). Nous avons donc procédé à l'essai du propranolol sur notre modèle cellulaire de médulloblastomes, stimulé au PMA. Le premier constat est la diminution de la sécrétion de proMMP-9 induite par le PMA dans le milieu de culture des cellules tumorales en réponse au propranolol.

Sachant que la sécrétion de MMP-9 est intimement liée à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Kim *et al.*, 2011), cette dernière a été examinée après stimulation au PMA ainsi qu'au propranolol. La dégradation d'I $\kappa$ B, provoquée par le PMA, est effectivement renversée par l'ajout d'une dose croissante de notre agent pharmacologique, en accord avec la diminution de MMP-9 observée. La cinétique de phosphorylation d'I $\kappa$ B initiant l'étape de dégradation a aussi pu être vérifiée. Cette phosphorylation accrue est suivie de la disparition de la protéine. Encore une fois en accord avec les résultats précédents, le propranolol empêche la phosphorylation d'I $\kappa$ B, scellant son interaction au complexe NF- $\kappa$ B même après stimulation au PMA. Finalement, nos résultats suggèrent aussi l'implication d'un rôle concomitant du propranolol au niveau des voies MAPK et PI3K/Akt. Effectivement, ces deux axes de signalisation ont un rôle bien documenté dans la régulation de la prolifération cellulaire, de



la migration ainsi que de la survie (Adjei, 2001 ; Kennedy *et al.*, 1997). Ainsi, nous avons démontré que le propranolol inhibe considérablement la phosphorylation des deux acteurs principaux respectifs de ces voies, Erk et Akt, en réponse à une stimulation au PMA (Figure 10).

L'un des objectifs du ciblage pharmacologique dans une optique thérapeutique porte sur la démonstration que l'agent utilisé n'incombe pas une forte toxicité cellulaire. Nous avons évalué cet aspect d'une part à partir d'une expérience de prolifération cellulaire et, d'autre part, par le dosage de l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH). Bien qu'une baisse significative du niveau de phosphorylation d'Akt soit notée après traitement au propranolol, il est intéressant d'observer que cet effet ne se traduit pas systématiquement par l'induction de la mort cellulaire. Effectivement, le propranolol ayant été utilisé comme agent thérapeutique cardiaque depuis plusieurs décennies, il n'est pas surprenant de constater que cet agent est à priori inoffensif envers les cellules saines.

En accord avec les résultats présentés dans cette étude, des données subséquentes supportent que le ciblage pharmacologique des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques mènerait à l'inhibition de l'axe de signalisation NF- $\kappa$ B ainsi que de la sécrétion de MMP-9 dans les cellules tumorales pancréatiques (Zhang *et al.*, 2010). D'autre part, une équipe a démontré que le blocage des récepteurs  $\beta$ 1- ou  $\beta$ 2-adrénergiques induit indépendamment une diminution de MMP-9, proposant un rôle similaire de chacun des membres (Romana-Souza, Santos et Monte-Alto-Costa, 2009). En résumé, nos recherches ont permis la découverte d'un rôle nouveau des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques dans la cancérogénèse. Nous avons élucidé un mécanisme d'action du propranolol antagoniste à une signalisation induite par un agent carcinogène. Ces résultats incitent, de plus, un intérêt rehaussé à une panoplie de composés de la classe des  $\beta$ -bloquants (Sotalol, Carvedilol).

## **2 La modulation pharmacologique de la signalisation pro-inflammatoire**

Tel qu'énoncé au chapitre II, la seconde hypothèse de travail porte sur l'analyse d'un potentiel anti-inflammatoire du lupeol dépendant, d'une part, de la voie de signalisation NF-

$\kappa$ B et possiblement, d'autre part, d'un mécanisme tributaire intracellulaire à MT1-MMP. L'une des originalités de ce projet est l'utilisation d'un agent carcinogène, le PMA, afin de stimuler les voies de signalisation d'intérêt contre lesquelles notre agent pharmacologique sera employé. Nous sommes ainsi parvenus à démontrer que la modulation de la voie NF- $\kappa$ B menant à l'expression de COX-2 par le lupeol était aussi observable dans notre modèle cellulaire. Par contre, contrairement à ce que la littérature rapporte concernant le pouvoir du lupeol à inhiber COX-2 via cet axe (Saleem, 2009), notre modèle cellulaire suggère plutôt une synergie d'action de nos deux agents, le PMA et le lupeol. En accord avec ces derniers résultats, la sécrétion de MMP-9 induite par les cellules tumorales est d'autant plus grande lorsque le lupeol est utilisé en synergie avec le PMA, confirmant une fois de plus la modulation de l'axe NF- $\kappa$ B en réponse à la stimulation des deux agents. Il est important de noter que le lupeol seul n'affecte pas la signalisation basale cellulaire.

L'un des objectifs de cette étude était d'évaluer la contribution de l'axe MT1-MMP au phénotype inflammatoire et invasif dépendant de NF- $\kappa$ B en réponse au PMA/lupeol. Effectivement, de nombreuses fonctions signalétiques ont été attribuées à cette métalloprotéase, notamment le contrôle de l'apoptose via son transit du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique (Proulx-Bonneau, Pratt et Annabi, 2010), l'expression de COX-2 dépendante d'une signalisation de la portion cytosolique et, finalement, le largage du marqueur CD44 de la membrane induit par RhoA chez le glioblastome (Annabi *et al.*, 2005). Peu de données traitent néanmoins du mécanisme par lequel la portion cytosolique de MT1-MMP contribue à la signalisation intracellulaire, qui régule notamment la voie Erk (Gingras et Béliveau, 2010) et Rac1 (Gonzalo *et al.*, 2010). Certains résidus de la queue cytoplasmique semblent de plus impliqués dans cette transduction du signal, tels que Cys<sup>574</sup> (Rozanov *et al.*, 2001) ainsi que Tyr<sup>573</sup> (Gonzalo *et al.*, 2010): L'inhibition de MT1-MMP a premièrement été validée suite à l'utilisation d'un ARN interférent correspondant, tant au niveau génique que protéique. En accord avec la littérature, (Sina *et al.*, 2010), la diminution de MT1-MMP conduit à une diminution de l'expression de COX-2 d'une part et de la MMP-9 d'autre part. Cependant, ceci n'affecte pas le pouvoir synergique du lupeol à l'égard du PMA, comme démontré par la hausse accrue d'expression de ces deux dernières protéines lors d'un co-traitement. Cette déduction est de plus confirmée par l'analyse de l'expression génique, qui présente un profil semblable

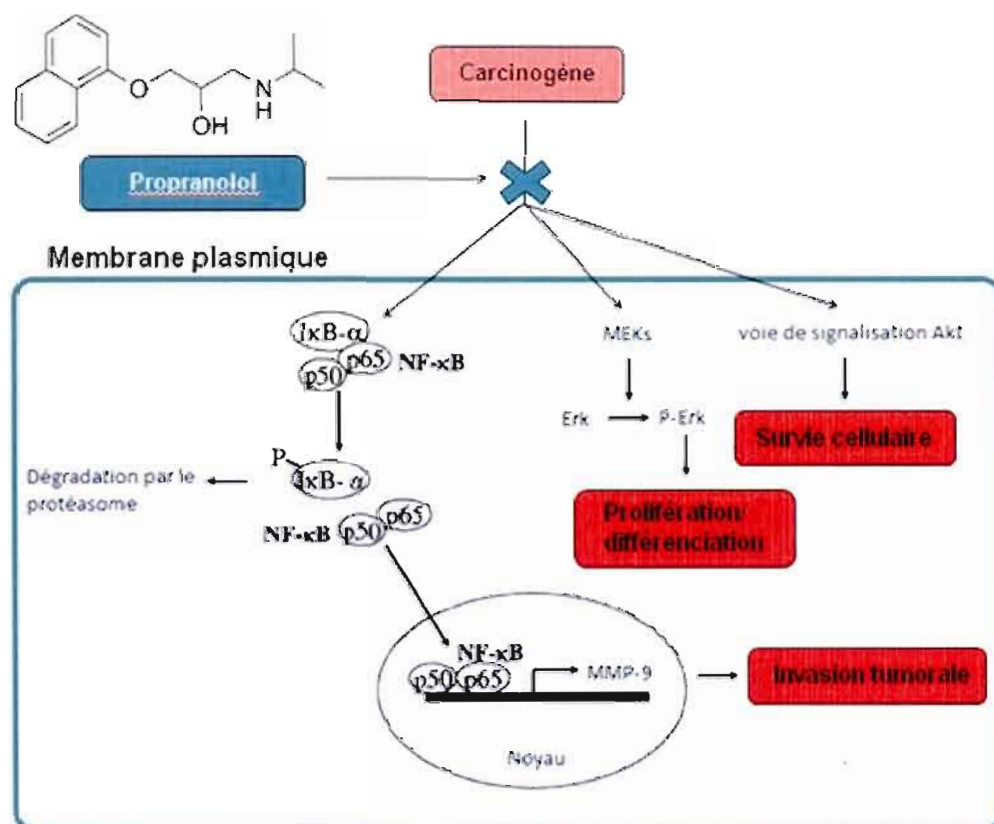
pour l'ARNm de COX-2 mais non pour le transcrit de la MMP-9. Effectivement, la synergie du lupeol avec le PMA ne semble pas se traduire par une augmentation de la synthèse du transcrit. Sachant que la protéine chaperonne HuR est nécessaire à la stabilisation de ce transcrit (Annabi *et al.*, 2006), il fut pertinent d'évaluer les niveaux de cette dernière, l'hypothèse étant qu'à expression génique égale, un taux plus élevé de HuR stabilise d'autant plus l'étape post-transcriptionnelle et diminue la propension de l'ARNm pour la dégradation. Ceci explique de plus pourquoi un taux plus important de MMP-9 active ne signifie pas systématiquement un taux transcriptionnel correspondant. En accord avec notre hypothèse, les niveaux de HuR plafonnent lors du traitement concomitant du lupeol et du PMA, élucidant un nouveau mécanisme cellulaire par lequel le lupeol agit. Il est intéressant de noter que l'augmentation du niveau d'expression génique de MT1-MMP induite par le PMA est renversée par le lupeol. Il n'est donc pas exclu qu'une signalisation pro-MT1-MMP indépendante de NF- $\kappa$ B soit modulée par le lupeol en réponse au PMA. Des études supplémentaires sur l'impact du lupeol sur diverses voies de signalisations seront donc nécessaires.

En résumé, nous avons démontré que le lupeol module la voie NF- $\kappa$ B induite par le PMA, conduisant à l'expression de COX-2 ainsi que de la MMP-9. Ce mécanisme synergique n'est pas dépendant de l'axe MT1-MMP qui, toutefois, contribue dans notre modèle à l'induction de COX-2 tel que rapporté précédemment (Sina *et al.*, 2010). Finalement, le lupeol induit la surexpression de la protéine chaperonne HuR, expliquant via la modulation post-transcriptionnelle de l'ARNm de la MMP-9 l'écart majeur entre son expression génique et sa sécrétion. Bien que ces données ne supportent pas le courant de pensée actuel selon lequel le lupeol possède des propriétés anti-inflammatoire et anti-tumorales, nous illustrons dans un modèle néoplasique cérébral une modulation nouvelle au phénotype tumoral engendré par un carcinogène. Nous avons de plus associé ces effets à un mécanisme signalétique dépendant de l'axe NF- $\kappa$ B et impliquant, en partie, la contribution de la protéine chaperonne HuR à la stabilisation du transcrit primaire de la MMP-9.

### 3 Conclusion et perspectives

Nos travaux ont permis de documenter le mécanisme de deux agents pharmacologiques, le lupeol et le propranolol, dans le ciblage de l'inflammation et de l'invasion tumorale. Ces mécanismes modulent un axe signalétique central au développement néoplasique, la voie NF- $\kappa$ B, régissant la synthèse notamment de la métalloprotéase MMP-9 et de COX-2. Nous avons démontré que le propranolol inhibe non seulement la synthèse de MMP-9 via la voie NF- $\kappa$ B, mais aussi les voies de prolifération et de survie, sans pour autant compromettre la viabilité des cellules saines. Nous avons de plus constaté une modulation synergique de l'inflammation lorsque le lupeol est couplé à un agent carcinogène, le PMA. Alors que la contribution de COX-2 à l'inflammation dans notre modèle tumoral est associée à un axe MT1-MMP, le mécanisme du lupeol en synergie au PMA lui n'est pas dépendant de cet axe. Nous avons finalement démontré qu'une partie de cette cascade moléculaire est tributaire à la surexpression de la protéine HuR stabilisant le transcrit primaire de la MMP-9.

Ces données ouvrent ainsi un nouveau courant de pensée sur de nouvelles cibles pharmacologiques, notamment tout l'aspect des récepteurs adrénergiques dont la contribution au phénotype tumoral était jusqu'à présent inconnue. Les résultats encourageants du propranolol nous permettent d'envisager le rôle proéminent d'autres agents antagonistes à ces récepteurs, plus spécifiques que le propranolol. L'utilisation d'ARN interférant spécifique à certains de ces récepteurs permettrait, de plus, de confirmer leurs rôles dans la signalisation menant au caractère invasif et même l'identification d'un membre explicite à l'origine de ces effets. Finalement, cet ouvrage dénote l'importance du phénotype inflammatoire dans l'invasion tumorale, empressant le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant l'inflammation induite par la voie NF- $\kappa$ B.



**Figure 4.1 Résumé du mode d'action proposé par le propranolol**

La stimulation par un carcinogène, dans ce cas le PMA, conduit notamment à l'activation des voies de signalisation NF- $\kappa$ B, MAPK et Akt. Le mécanisme d'action proposé du propranolol consiste en l'inhibition de la transduction du signal en aval de ces voies de signalisation, résultant en l'inhibition du phénotype invasif tumoral, de la survie et de la prolifération.

## RÉFÉRENCES

- Abayomi, O., M. S. Chun et K. Kelly. 1990. Cerebral calcification and learning disabilities following cranial irradiation for medulloblastoma. *Journal of the National Medical Association*, vol. 82, no 12, p. 833-836.
- Abbott, N. J., L. Ronnback et E. Hansson. 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews. Neuroscience*, vol. 7, no 1, p. 41-53.
- Adjei, A. A. 2001. Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 93, no 14, p. 1062-1074.
- Aggarwal, B. B., et B. Sung. 2011. The relationship between inflammation and cancer is analogous to that between fuel and fire. *Oncology*, vol. 25, no 5, p. 414-418.
- Aggarwal, B. B., R. V. Vijayalekshmi et B. Sung. 2009. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 15, no 2, p. 425-430.
- Amalinei, C., I. D. Caruntu, S. E. Giusca et R. A. Balan. 2010. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*, vol. 51, no 2, p. 215-228.
- Amos, S., P. M. Martin, G. A. Polar, S. J. Parsons et I. M. Hussaini. 2005. Phorbol 12-myristate 13-acetate induces epidermal growth factor receptor transactivation via protein kinase Cdelta/c-Src pathways in glioblastoma cells. *The Journal of biological chemistry*, vol. 280, no 9, p. 7729-7738.
- Annabi, B., M. Bouzeghrane, J. C. Currie, H. Dulude, L. Daigneault, S. Garde, S. A. Rabbani, C. Panchal, J. J. Wu et R. Beliveau. 2006. Inhibition of MMP-9 secretion by the anti-metastatic PSP94-derived peptide PCK3145 requires cell surface laminin receptor signaling. *Anti-cancer drugs*, vol. 17, no 4, p. 429-438.
- Annabi, B., M. Bouzeghrane, R. Moundjian, A. Moghrabi et R. Beliveau. 2005. Probing the infiltrating character of brain tumors: inhibition of RhoA/ROK-mediated CD44 cell surface shedding from glioma cells by the green tea catechin EGCG. *Journal of neurochemistry*, vol. 94, no 4, p. 906-916.
- Annabi, B., J. C. Currie, A. Moghrabi et R. Beliveau. 2007. Inhibition of HuR and MMP-9 expression in macrophage-differentiated HL-60 myeloid leukemia cells by green tea polyphenol EGCG. *Leukemia research*, vol. 31, no 9, p. 1277-1284.
- Annabi, B., M. P. Lachambre, N. Bousquet-Gagnon, M. Page, D. Gingras et R. Beliveau. 2002. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion

- and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells. *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1542, no 1-3, p. 209-220.
- Annabi, B., M. P. Lachambre, K. Plouffe, R. Moumdjian et R. Beliveau. 2009a. Propranolol adrenergic blockade inhibits human brain endothelial cells tubulogenesis and matrix metalloproteinase-9 secretion. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*, vol. 60, no 5, p. 438-445.
- Annabi, B., C. Laflamme, A. Sina, M. P. Lachambre et R. Béliveau. 2009b. A MT1-MMP/NF- $\kappa$ B signaling axis as a checkpoint controller of COX-2 expression in CD133(+) U87 glioblastoma cells. *Journal of neuroinflammation*, vol. 6, no 1, p. 8.
- Annabi, B., S. Rojas-Sutterlin, C. Laflamme, M. P. Lachambre, Y. Rolland, H. Sartelet et R. Beliveau. 2008a. Tumor environment dictates medulloblastoma cancer stem cell expression and invasive phenotype. *Molecular cancer research : MCR*, vol. 6, no 6, p. 907-916.
- Annabi, B., S. Rojas-Sutterlin, M. Laroche, M. P. Lachambre, R. Moumdjian et R. Beliveau. 2008b. The diet-derived sulforaphane inhibits matrix metalloproteinase-9-activated human brain microvascular endothelial cell migration and tubulogenesis. *Molecular nutrition & food research*, vol. 52, no 6, p. 692-700.
- Baldwin, A. S. 2001. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *The Journal of clinical investigation*, vol. 107, no 3, p. 241-246.
- Balkwill, F., et A. Mantovani. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, vol. 357, no 9255, p. 539-545.
- Ballif, B. A., N. V. Mincek, J. T. Barratt, M. L. Wilson et D. L. Simmons. 1996. Interaction of cyclooxygenases with an apoptosis- and autoimmunity-associated protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, no 11, p. 5544-5549.
- Banks, W. A. 2010. Immunotherapy and neuroimmunology in Alzheimer's disease: a perspective from the blood-brain barrier. *Immunotherapy*, vol. 2, no 1, p. 1-3.
- Barbolina, M. V., et M. S. Stack. 2008. Membrane type 1-matrix metalloproteinase: substrate diversity in pericellular proteolysis. *Seminars in cell & developmental biology*, vol. 19, no 1, p. 24-33.
- Barrett, B., et P. McKenna. 2011. Communicating benefits and risks of screening for prostate, colon, and breast cancer. *Family medicine*, vol. 43, no 4, p. 248-253.
- Beg, A. A., et A. S. Baldwin, Jr. 1993. The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes & development*, vol. 7, no 11, p. 2064-2070.



- Beliveau, R., et D. Gingras. 2007. Role of nutrition in preventing cancer. *Canadian family physician Medecin de famille canadien*, vol. 53, no 11, p. 1905-1911.
- Bellot, P., J. C. Garcia-Pagan, J. G. Abraldes et J. Bosch. 2008. Primary prophylaxis of esophageal variceal bleeding in cirrhosis. *Gastroenterologie clinique et biologique*, vol. 32, no 5 Pt 1, p. 532-540.
- Benny, O., et P. Pakneshan. 2009. Novel technologies for antiangiogenic drug delivery in the brain. *Cell adhesion & migration*, vol. 3, no 2, p. 224-229.
- Bernabeu-Wittel, J., J. J. Pereyra-Rodriguez, M. E. Mantrana-Bermejo, I. Fernandez-Pineda, J. C. de Agustin et J. Conejo-Mir. 2011. Propranolol for the Treatment of Severe Hemangiomas of Infancy: Results From a Series of 28 Patients. *Actas dermo-sifiliograficas*, vol. 102, no 7, p. 510-516.
- Bomsztyk, K., J. W. Rooney, T. Iwasaki, N. A. Rachie, S. K. Dower et C. H. Sibley. 1991. Evidence that interleukin-1 and phorbol esters activate NF-kappa B by different pathways: role of protein kinase C. *Cell regulation*, vol. 2, no 4, p. 329-335.
- Bonnet, N., D. D. Pierroz et S. L. Ferrari. 2008. Adrenergic control of bone remodeling and its implications for the treatment of osteoporosis. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*, vol. 8, no 2, p. 94-104.
- Bourboulia, D., et W. G. Stetler-Stevenson. 2010. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Seminars in cancer biology*, vol. 20, no 3, p. 161-168.
- Bowen, I. D. 1993. Apoptosis or programmed cell death? *Cell biology international*, vol. 17, no 4, p. 365-380.
- Bradbury, M. W. 1993. The blood-brain barrier. *Experimental physiology*, vol. 78, no 4, p. 453-472.
- Breccia, M., F. Efficace et G. Alimena. 2011. Imatinib treatment in chronic myelogenous leukemia: What have we learned so far? *Cancer letters*, vol. 300, no 2, p. 115-121.
- Broderson, J. M. 1995. Surgical options for brain tumor treatment. *Critical care nursing clinics of North America*, vol. 7, no 1, p. 91-102.
- Cabodi, S., et D. Taverna. 2010. Interfering with inflammation: a new strategy to block breast cancer self-renewal and progression? *Breast cancer research : BCR*, vol. 12, no 2, p. 305.
- Carr, D., L. Goudas, D. Lawrence, W. Pirl, J. Lau, D. DeVine, B. Kupelnick et K. Miller. 2002. Management of cancer symptoms: pain, depression, and fatigue. *Evidence report/technology assessment*, no 61, p. 1-5.



- Cavallo, F., C. De Giovanni, P. Nanni, G. Forni et P. L. Lollini. 2011. 2011: the immune hallmarks of cancer. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, vol. 60, no 3, p. 319-326.
- Chaturvedi, M. M., B. Sung, V. R. Yadav, R. Kannappan et B. B. Aggarwal. 2011. NF-kappaB addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all'. *Oncogene*, vol. 30, no 14, p. 1615-1630.
- Choi, Y. K., et K. W. Kim. 2008. Blood-neural barrier: its diversity and coordinated cell-to-cell communication. *BMB reports*, vol. 41, no 5, p. 345-352.
- Cohen, M. H., G. Williams, J. R. Johnson, J. Duan, J. Gobburu, A. Rahman, K. Benson, J. Leighton, S. K. Kim, R. Wood, M. Rothmann, G. Chen, K. M. U, A. M. Staten et R. Pazdur. 2002. Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 8, no 5, p. 935-942.
- Costa, C., R. Soares, J. S. Reis-Filho, D. Leitao, I. Amendoeira et F. C. Schmitt. 2002. Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *Journal of clinical pathology*, vol. 55, no 6, p. 429-434.
- Coussens, L. M., et Z. Werb. 2002. Inflammation and cancer. *Nature*, vol. 420, no 6917, p. 860-867.
- Crews, C. M., A. Alessandrini et R. L. Erikson. 1992. Erks: their fifteen minutes has arrived. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 3, no 2, p. 135-142.
- Dahele, M., et S. Senan. 2010. Radiation oncology: overview and recent advances. *The journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*, vol. 40, no 2, p. 136-143; quiz 143-134.
- Demeule, M., J. C. Currie, Y. Bertrand, C. Che, T. Nguyen, A. Regina, R. Gabathuler, J. P. Castaigne et R. Beliveau. 2008. Involvement of the low-density lipoprotein receptor-related protein in the transcytosis of the brain delivery vector angiopep-2. *Journal of neurochemistry*, vol. 106, no 4, p. 1534-1544.
- Demeule, M., A. Regina, B. Annabi, Y. Bertrand, M. W. Bojanowski et R. Beliveau. 2004. Brain endothelial cells as pharmacological targets in brain tumors. *Molecular neurobiology*, vol. 30, no 2, p. 157-183.
- Demeule, M., A. Regina, C. Che, J. Poirier, T. Nguyen, R. Gabathuler, J. P. Castaigne et R. Beliveau. 2007. Identification and Design of Peptides as a New Drug Delivery System for the Brain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 324, no 3, p. 1064-1072.

- Deryugina, E. I., et J. P. Quigley. 2006. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, vol. 25, no 1, p. 9-34.
- Doller, A., J. Pfeilschifter et W. Eberhardt. 2008. Signalling pathways regulating nucleo-cytoplasmic shuttling of the mRNA-binding protein HuR. *Cellular signalling*, vol. 20, no 12, p. 2165-2173.
- Dufour, A., N. S. Sampson, S. Zucker et J. Cao. 2008. Role of the hemopexin domain of matrix metalloproteinases in cell migration. *Journal of cellular physiology*, vol. 217, no 3, p. 643-651.
- Edwards, R. A., M. Witherspoon, K. Wang, K. Afrasiabi, T. Pham, L. Birnbaumer et S. M. Lipkin. 2009. Epigenetic repression of DNA mismatch repair by inflammation and hypoxia in inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer. *Cancer research*, vol. 69, no 16, p. 6423-6429.
- Emonard, H., G. Bellon, P. de Diesbach, M. Mettlen, W. Hornebeck et P. J. Courtoy. 2005. Regulation of matrix metalloproteinase (MMP) activity by the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP). A new function for an "old friend". *Biochimie*, vol. 87, no 3-4, p. 369-376.
- Etienne, G., et F. X. Mahon. 2001. [Leukemogenesis and new therapy development: the example of chronic myelogenous leukemia]. *Bulletin du cancer*, vol. 88, no 7, p. 651-658.
- Fan, X. C., et J. A. Steitz. 1998. Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *The EMBO journal*, vol. 17, no 12, p. 3448-3460.
- Fialcowitz-White, E. J., B. Y. Brewer, J. D. Ballin, C. D. Willis, E. A. Toth et G. M. Wilson. 2007. Specific protein domains mediate cooperative assembly of HuR oligomers on AU-rich mRNA-destabilizing sequences. *The Journal of biological chemistry*, vol. 282, no 29, p. 20948-20959.
- Fitzgerald, P. J. 2010. Testing whether drugs that weaken norepinephrine signaling prevent or treat various types of cancer. *Clinical epidemiology*, vol. 2, p. 1-3.
- Fonarow, G. C. 2006. Beta-blockers for the post-myocardial infarction patient: current clinical evidence and practical considerations. *Reviews in cardiovascular medicine*, vol. 7, no 1, p. 1-9.
- Fortier, S., M. Touaibia, S. Lord-Dufour, J. Galipeau, R. Roy et B. Annabi. 2008. Tetra- and hexavalent mannosides inhibit the pro-apoptotic, antiproliferative and cell surface clustering effects of concanavalin-A: impact on MT1-MMP functions in marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Glycobiology*, vol. 18, no 2, p. 195-204.

- Fridman, R., M. Toth, D. Pena et S. Mobashery. 1995. Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). *Cancer research*, vol. 55, no 12, p. 2548-2555.
- Furie, M. B., et G. J. Randolph. 1995. Chemokines and tissue injury. *The American journal of pathology*, vol. 146, no 6, p. 1287-1301.
- Garg, A., et B. B. Aggarwal. 2002. Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, vol. 16, no 6, p. 1053-1068.
- Georgescu, M. M. 2010. PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control. *Genes & cancer*, vol. 1, no 12, p. 1170-1177.
- Gingras, D. Béliveau, B. 2010. Emerging concepts in the regulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity. *Biochim Biophys Acta* 1803(1):142-50.
- Ghosh, N., R. Chaki, V. Mandal et S. C. Mandal. 2010. COX-2 as a target for cancer chemotherapy. *Pharmacological reports : PR*, vol. 62, no 2, p. 233-244.
- Girdhani, S., S. M. Bhosle, S. A. Thulsidas, A. Kumar et K. P. Mishra. 2005. Potential of radiosensitizing agents in cancer chemo-radiotherapy. *Journal of cancer research and therapeutics*, vol. 1, no 3, p. 129-131.
- Goldberg, T. B., M. A. Rodrigues, R. T. Takata, C. R. Nogueira et A. T. Faleiros. 2003. [Growth hormone deficiency after treatment of medulloblastoma with radiotherapy in childhood: case report]. *Arquivos de neuro-psiquiatria*, vol. 61, no 2B, p. 482-485.
- Greenlee, K. J., Z. Werb et F. Kheradmand. 2007. Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted. *Physiological reviews*, vol. 87, no 1, p. 69-98.
- Grivennikov, Sergei I., Florian R. Greten et Michael Karin. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, vol. 140, no 20303878, p. 883-899.
- Gonzalo P, Guadamillas MC, Hernández-Riquer MV, Pollán A, Grande-García A, Bartolomé RA, Vasanji A, Ambrogio C, Chiarle R, Teixidó J, Risteli J, Apte SS, del Pozo MA, Arroyo AG. 2010. MT1-MMP is required for myeloid cell fusion via regulation of Rac1 signaling. *Dev Cell* 18(1):77-89.
- Groothuis, D. R. 2000. The blood-brain and blood-tumor barriers: a review of strategies for increasing drug delivery. *Neuro-oncology*, vol. 2, no 1, p. 45-59.
- Gupta, S. C., J. H. Kim, R. Kannappan, S. Reuter, P. M. Dougherty et B. B. Aggarwal. 2011. Role of nuclear factor kappaB-mediated inflammatory pathways in cancer-related symptoms and their regulation by nutritional agents. *Experimental biology and medicine*, vol. 236, no 6, p. 658-671.

- Hailey, J., E. Maxwell, K. Koukouras, W. R. Bishop, J. A. Pachter et Y. Wang. 2002. Neutralizing anti-insulin-like growth factor receptor 1 antibodies inhibit receptor function and induce receptor degradation in tumor cells. *Molecular cancer therapeutics*, vol. 1, no 14, p. 1349-1353.
- Hanahan, Douglas, et Robert A Weinberg. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, vol. 144, no 5, p. 646-674.
- Harrison, L. B., M. Chadha, R. J. Hill, K. Hu et D. Shasha. 2002. Impact of tumor hypoxia and anemia on radiation therapy outcomes. *The oncologist*, vol. 7, no 6, p. 492-508.
- Hata, K., K. Hori, J. Murata et S. Takahashi. 2005. Remodeling of actin cytoskeleton in lupeol-induced B16 2F2 cell differentiation. *Journal of biochemistry*, vol. 138, no 4, p. 467-472.
- He, Y., F. Liu, L. Zhang, Y. Wu, B. Hu, Y. Zhang, Y. Li et H. Liu. 2011. Growth inhibition and apoptosis induced by lupeol, a dietary triterpene, in human hepatocellular carcinoma cells. *Biological & pharmaceutical bulletin*, vol. 34, no 4, p. 517-522.
- Himelstein, B. P., R. Canete-Soler, E. J. Bernhard, D. W. Dilks et R. J. Muschel. 1994. Metalloproteinases in tumor progression: the contribution of MMP-9. *Invasion & metastasis*, vol. 14, no 1-6, p. 246-258.
- Hornebeck, W., E. Lambert, E. Petitfrere et P. Bernard. 2005. Beneficial and detrimental influences of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in tumor progression. *Biochimie*, vol. 87, no 3-4, p. 377-383.
- Hur, J. H., M. J. Park, I. C. Park, D. H. Yi, C. H. Rhee, S. I. Hong et S. H. Lee. 2000. Matrix metalloproteinases in human gliomas: activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) may be correlated with membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) expression. *Journal of Korean medical science*, vol. 15, no 3, p. 309-314.
- Huwiler, A., S. Akool el, A. Aschrafi, F. M. Hamada, J. Pfeilschifter et W. Eberhardt. 2003. ATP potentiates interleukin-1 beta-induced MMP-9 expression in mesangial cells via recruitment of the ELAV protein HuR. *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no 51, p. 51758-51769.
- Ingber, D. E., et J. Folkman. 1989. Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix. *The Journal of cell biology*, vol. 109, no 1, p. 317-330.
- Irigaray, P., J. A. Newby, R. Clapp, L. Hardell, V. Howard, L. Montagnier, S. Epstein et D. Belpomme. 2007. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, vol. 61, no 10, p. 640-658.

- Kaltschmidt, B., et C. Kaltschmidt. 2009. NF-kappaB in the nervous system. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 1, no 3, p. a001271.
- Kanu, O. O., A. Mehta, C. Di, N. Lin, K. Bortoff, D. D. Bigner, H. Yan et D. C. Adamson. 2009. Glioblastoma multiforme: a review of therapeutic targets. *Expert opinion on therapeutic targets*, vol. 13, no 6, p. 701-718.
- Karin, M. 2009. NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 1, no 5, p. a000141.
- Karkan, D., C. Pfeifer, T. Z. Vitalis, G. Arthur, M. Ujiie, Q. Chen, S. Tsai, G. Koliatis, R. Gabathuler et W. A. Jefferies. 2008. A unique carrier for delivery of therapeutic compounds beyond the blood-brain barrier. *PloS one*, vol. 3, no 6, p. e2469.
- Kennedy, S. G., A. J. Wagner, S. D. Conzen, J. Jordan, A. Bellacosa, P. N. Tsichlis et N. Hay. 1997. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes & development*, vol. 11, no 6, p. 701-713.
- Kessenbrock, K., V. Plaks et Z. Werb. 2010. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, vol. 141, no 1, p. 52-67.
- Khan, N., V. M. Adhami et H. Mukhtar. 2010. Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of prostate cancer. *Endocrine-related cancer*, vol. 17, no 1, p. R39-52.
- Kim, J. H., J. A. Park, S. W. Lee, W. J. Kim, Y. S. Yu et K. W. Kim. 2006. Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface. *Journal of biochemistry and molecular biology*, vol. 39, no 4, p. 339-345.
- Kim, Y., H. Kang, S. W. Jang et J. Ko. 2011. Celastrol Inhibits Breast Cancer Cell Invasion via Suppression of NF-kB-mediated Matrix Metalloproteinase-9 Expression. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, vol. 28, no 2, p. 175-184.
- Klein, T., et R. Bischoff. 2011. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino acids*, vol. 41, no 2, p. 271-290.
- Kohrmann, A., U. Kammerer, M. Kapp, J. Dietl et J. Anacker. 2009. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC cancer*, vol. 9, p. 188.
- Kwon, O., E. Lee, T. C. Moon, H. Jung, C. X. Lin, K. S. Nam, S. H. Baek, H. K. Min et H. W. Chang. 2002. Expression of cyclooxygenase-2 and pro-inflammatory cytokines induced by 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB 153) in human mast cells requires NF-kappa B activation. *Biological & pharmaceutical bulletin*, vol. 25, no 9, p. 1165-1168.

- L'Allemain, G. 2002. [The hypoxia-inducible factor HIF as a new target in cancer research]. *Bulletin du cancer*, vol. 89, no 3, p. 257-260.
- Lakhan, S. E., et L. Harle. 2009. Difficult diagnosis of brainstem glioblastoma multiforme in a woman: a case report and review of the literature. *Journal of medical case reports*, vol. 3, p. 87.
- Leaute-Labreze, C., E. Dumas de la Roque, T. Hubiche, F. Boralevi, J. B. Thambo et A. Taieb. 2008. Propranolol for severe hemangiomas of infancy. *The New England journal of medicine*, vol. 358, no 24, p. 2649-2651.
- Lee, S., S. Shin, H. Kim, S. Han, K. Kim, J. Kwon, J. H. Kwak, C. K. Lee, N. J. Ha et D. Yim. 2011. Anti-inflammatory function of arctiin by inhibiting COX-2 expression via NF-kappaB pathways. *Journal of inflammation*, vol. 8, no 1, p. 16.
- Lewis, J. G., et D. O. Adams. 1987. Inflammation, oxidative DNA damage, and carcinogenesis. *Environmental health perspectives*, vol. 76, p. 19-27.
- Liabakk, N. B., I. Talbot, R. A. Smith, K. Wilkinson et F. Balkwill. 1996. Matrix metalloprotease 2 (MMP-2) and matrix metalloprotease 9 (MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer. *Cancer research*, vol. 56, no 1, p. 190-196.
- Lillis, A. P., L. B. Van Duyn, J. E. Murphy-Ullrich et D. K. Strickland. 2008. LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiological reviews*, vol. 88, no 3, p. 887-918.
- Liu, S. F., X. Ye et A. B. Malik. 1999. Inhibition of NF-kappaB activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents In vivo expression of proinflammatory genes. *Circulation*, vol. 100, no 12, p. 1330-1337.
- Llorca, P. M., et M. A. Wolf. 1991. [Use of certain cardiological drugs in the treatment of schizophrenia: review of the literature]. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN*, vol. 16, no 1, p. 19-24.
- Ma, Z., R. C. Shah, M. J. Chang et E. N. Benveniste. 2004. Coordination of cell signaling, chromatin remodeling, histone modifications, and regulator recruitment in human matrix metalloproteinase 9 gene transcription. *Molecular and cellular biology*, vol. 24, no 12, p. 5496-5509.
- Marshall, M. S. 1995. Ras target proteins in eukaryotic cells. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 9, no 13, p. 1311-1318.
- Martin, O. A., C. E. Redon, J. S. Dickey, A. J. Nakamura et W. M. Bonner. 2011. Para-inflammation mediates systemic DNA damage in response to tumor growth. *Communicative & integrative biology*, vol. 4, no 1, p. 78-81.

- Mazloom, A., A. H. Zangeneh et A. C. Paulino. 2010. Prognostic factors after extraneural metastasis of medulloblastoma. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, vol. 78, no 1, p. 72-78.
- McDonald, J. A. 1988. Extracellular matrix assembly. *Annual review of cell biology*, vol. 4, p. 183-207.
- Meisner NC, Filipowicz W. 2010. Properties of the regulatory RNA-binding protein HuR and its role in controlling miRNA repression. *Adv Exp Med Biol* 700:106-23.
- Merlo, G. R., F. Basolo, L. Fiore, L. Duboc et N. E. Hynes. 1995. p53-dependent and p53-independent activation of apoptosis in mammary epithelial cells reveals a survival function of EGF and insulin. *Journal of cell biology*, vol. 128, no 6, p. 1185-1196.
- Mori, K., M. Shibamura et K. Nose. 2004. Invasive potential induced under long-term oxidative stress in mammary epithelial cells. *Cancer research*, vol. 64, no 20, p. 7464-7472.
- Murat, A., E. Migliavacca, T. Gorlia, W. L. Lambiv, T. Shay, M. F. Hamou, N. de Tribolet, L. Regli, W. Wick, M. C. Kouwenhoven, J. A. Hainfellner, F. L. Heppner, P. Y. Dietrich, Y. Zimmer, J. G. Cairncross, R. C. Janzer, E. Domany, M. Delorenzi, R. Stupp et M. E. Hegi. 2008. Stem cell-related "self-renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 26, no 18, p. 3015-3024.
- Murtaza, I., M. Saleem, V. M. Adhami, B. B. Hafeez et H. Mukhtar. 2009. Suppression of cFLIP by lupeol, a dietary triterpene, is sufficient to overcome resistance to TRAIL-mediated apoptosis in chemoresistant human pancreatic cancer cells. *Cancer research*, vol. 69, no 3, p. 1156-1165.
- Nagase, H., R. Visse et G. Murphy. 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research*, vol. 69, no 3, p. 562-573.
- Nyalendo C, Michaud M, Beaulieu E, Roghi C, Murphy G, Gingras D, Béliveau R. 2007. Src-dependent phosphorylation of membrane type I matrix metalloproteinase on cytoplasmic tyrosine 573: role in endothelial and tumor cell migration. *J Biol Chem* 282(21):15690-9
- Ohtsuki, S. 2004. New aspects of the blood-brain barrier transporters; its physiological roles in the central nervous system. *Biological & pharmaceutical bulletin*, vol. 27, no 10, p. 1489-1496.
- Packer, R. J. 2005. Medulloblastoma. *Journal of neurosurgery*, vol. 103, no 4 Suppl, p. 299-300; discussion 300-291.

- Pei, D. 1999. Identification and characterization of the fifth membrane-type matrix metalloproteinase MT5-MMP. *The Journal of biological chemistry*, vol. 274, no 13, p. 8925-8932.
- Prichard, B. N. 1976. Propranolol in the treatment of angina: a review. *Postgraduate medical journal*, vol. 52 Suppl 4, p. 35-41.
- Prichard, B. N., et P. M. Gillam. 1969. Treatment of hypertension with propranolol. *British medical journal*, vol. 1, no 5635, p. 7-16.
- Proulx-Bonneau, S., J. Pratt et B. Annabi. 2010. A role for MT1-MMP as a cell death sensor/effector through the regulation of endoplasmic reticulum stress in U87 glioblastoma cells. *Journal of neuro-oncology*.
- Radi, Z. A. 2009. Pathophysiology of cyclooxygenase inhibition in animal models. *Toxicologic pathology*, vol. 37, no 1, p. 34-46.
- Raffel, C. 2004. Medulloblastoma: molecular genetics and animal models. *Neoplasia*, vol. 6, no 4, p. 310-322.
- Redzic, Z. 2011. Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences. *Fluids and barriers of the CNS*, vol. 8, no 1, p. 3.
- Ribatti, D., B. Nico, E. Crivellato et M. Artico. 2006. Development of the blood-brain barrier: a historical point of view. *Anatomical record. Part B, New anatomist*, vol. 289, no 1, p. 3-8.
- Roeb, E., K. Schleinkofer, T. Kernebeck, S. Potsch, B. Jansen, I. Behrmann, S. Matern et J. Grotzinger. 2002. The matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) hemopexin domain is a novel gelatin binding domain and acts as an antagonist. *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no 52, p. 50326-50332.
- Romagnolo, D. F., A. J. Papoutsis et O. Selmin. 2010. Nutritional targeting of cyclooxygenase-2 for colon cancer prevention. *Inflammation & allergy drug targets*, vol. 9, no 3, p. 181-191.
- Romana-Souza, B., J. S. Santos et A. Monte-Alto-Costa. 2009. beta-1 and beta-2, but not alpha-1 and alpha-2, adrenoceptor blockade delays rat cutaneous wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, vol. 17, no 2, p. 230-239.
- Romano, A., R. Freudenthal, E. Merlo et A. Routtenberg. 2006. Evolutionarily-conserved role of the NF-kappaB transcription factor in neural plasticity and memory. *The European journal of neuroscience*, vol. 24, no 6, p. 1507-1516.



- Ross, G. M. 1999. Induction of cell death by radiotherapy. *Endocrine-related cancer*, vol. 6, no 1, p. 41-44.
- Roy, R., J. Yang et M. A. Moses. 2009. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 27, no 31, p. 5287-5297.
- Rozanov DV, Deryugina EI, Ratnikov BI, Monosov EZ, Marchenko GN, Quigley JP, Strongin AY. 2001. Mutation analysis of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). The role of the cytoplasmic tail Cys(574), the active site Glu(240), and furin cleavage motifs in oligomerization, processing, and self-proteolysis of MT1-MMP expressed in breast carcinoma cells. *J Biol Chem* 276(28):25705-14
- Rubin, R., et R. Baserga. 1995. Insulin-like growth factor-I receptor. Its role in cell proliferation, apoptosis, and tumorigenicity. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, vol. 73, no 3, p. 311-331.
- Rudek, M. A., J. Venitz et W. D. Figg. 2002. Matrix metalloproteinase inhibitors: do they have a place in anticancer therapy? *Pharmacotherapy*, vol. 22, no 6, p. 705-720.
- Rudin, C. M., C. L. Hann, J. Laterra, R. L. Yauch, C. A. Callahan, L. Fu, T. Holcomb, J. Stinson, S. E. Gould, B. Coleman, P. M. LoRusso, D. D. Von Hoff, F. J. de Sauvage et J. A. Low. 2009. Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *The New England journal of medicine*, vol. 361, no 12, p. 1173-1178.
- Ruoslahti, E. 1996. Brain extracellular matrix. *Glycobiology*, vol. 6, no 5, p. 489-492.
- Sakamoto, K., et S. Maeda. 2010. Targeting NF-kappaB for colorectal cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*, vol. 14, no 6, p. 593-601.
- Saleem, M. 2009. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer letters*, vol. 285, no 2, p. 109-115.
- Saleem, M., N. Maddodi, M. Abu Zaid, N. Khan, B. bin Hafeez, M. Asim, Y. Suh, J. M. Yun, V. Setaluri et H. Mukhtar. 2008. Lupeol inhibits growth of highly aggressive human metastatic melanoma cells in vitro and in vivo by inducing apoptosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 14, no 7, p. 2119-2127.
- Saleem, M., I. Murtaza, O. Witkowsky, A. M. Kohl et N. Maddodi. 2009. Lupeol triterpene, a novel diet-based microtubule targeting agent: disrupts survivin/cFLIP activation in prostate cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 388, no 3, p. 576-582.
- Samant, R. S., et L. A. Shevde. 2011. Recent advances in anti-angiogenic therapy of cancer. *Oncotarget*, vol. 2, no 3, p. 122-134.

- Sanchez-Munoz, A., E. Perez-Ruiz, B. Jimenez, N. Ribelles, A. Marquez, I. Garcia-Rios et E. Alba Conejo. 2009. Targeted therapy of metastatic breast cancer. *Clin Transl Oncol*, vol. 11, no 10, p. 643-650.
- Sanchez, J., V. Baker et D. M. Miller. 1986. Basic mechanisms of metastasis. *The American journal of the medical sciences*, vol. 292, no 6, p. 376-385.
- Sano, H., Y. Kawahito, R. L. Wilder, A. Hashiramoto, S. Mukai, K. Asai, S. Kimura, H. Kato, M. Kondo et T. Hla. 1995. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer research*, vol. 55, no 17, p. 3785-3789.
- Sato, H., et M. Seiki. 1993. Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene*, vol. 8, no 2, p. 395-405.
- Schmedtje, J. F., Jr., Y. S. Ji, W. L. Liu, R. N. DuBois et M. S. Runge. 1997. Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappaB p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*, vol. 272, no 1, p. 601-608.
- Schneider, Stefan W., Thomas Ludwig, Lars Tatenhorst, Stephan Braune, Hans Oberleithner, Volker Senner et Werner Paulus. 2004. Glioblastoma cells release factors that disrupt blood-brain barrier features. *Acta Neuropathologica*, vol. 107, no 3, p. 272-276.
- Seeger, R., et E. G. Krebs. 1995. The MAPK signaling cascade. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 9, no 9, p. 726-735.
- Seiffert, E., J. P. Dreier, S. Ivens, I. Bechmann, O. Tomkins, U. Heinemann et A. Friedman. 2004. Lasting blood-brain barrier disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 24, no 36, p. 7829-7836.
- Sellers, W. R., et D. E. Fisher. 1999. Apoptosis and cancer drug targeting. *The Journal of clinical investigation*, vol. 104, no 12, p. 1655-1661.
- Seo, G. S. 2011. [The role of NF-kappaB in colon cancer]. *The Korean journal of gastroenterology*, vol. 57, no 1, p. 3-7.
- Shayan, Y. R., J. S. Prendiville et R. D. Goldman. 2011. Use of propranolol in treating hemangiomas. *Canadian family physician Medecin de famille canadien*, vol. 57, no 3, p. 302-303.
- Sica, A. 2010. Role of tumour-associated macrophages in cancer-related inflammation. *Experimental oncology*, vol. 32, no 3, p. 153-158.

- Siddique, H. R., et M. Saleem. 2011. Beneficial health effects of lupeol triterpene: a review of preclinical studies. *Life sciences*, vol. 88, no 7-8, p. 285-293.
- Sina, A., S. Proulx-Bonneau, A. Roy, L. Poliquin, J. Cao et B. Annabi. 2010. The lectin concanavalin-A signals MT1-MMP catalytic independent induction of COX-2 through an IKK $\gamma$ /NF- $\kappa$ B-dependent pathway. *Journal of cell communication and signaling*, vol. 4, no 1, p. 31-38.
- Slaga, T. J. 1983. Overview of tumor promotion in animals. *Environmental health perspectives*, vol. 50, p. 3-14.
- Sounni, N. E., L. Devy, A. Hajitou, F. Frankenke, C. Munaut, C. Gilles, C. Deroanne, E. W. Thompson, J. M. Foidart et A. Noel. 2002. MT1-MMP expression promotes tumor growth and angiogenesis through an up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 16, no 6, p. 555-564.
- Staudt, L. M. 2010. Oncogenic activation of NF-kappaB. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 2, no 6, p. a000109.
- Sternlicht, M. D., et Z. Werb. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual review of cell and developmental biology*, vol. 17, p. 463-516.
- Storch, C. H., et P. H. Hoeger. 2010. Propranolol for infantile haemangiomas: insights into the molecular mechanisms of action. *The British journal of dermatology*, vol. 163, no 2, p. 269-274.
- Sun, J. 2010. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases are essential for the inflammatory response in cancer cells. *Journal of signal transduction*, vol. 2010, p. 985132.
- Sun, M., P. Hillmann, B. T. Hofmann, J. R. Hart et P. K. Vogt. 2010. Cancer-derived mutations in the regulatory subunit p85 $\alpha$  of phosphoinositide 3-kinase function through the catalytic subunit p110 $\alpha$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no 35, p. 15547-15552.
- Taffel, M. 1947. Experiences in the treatment of neoplastic disease with nitrogen mustard. *The Yale journal of biology and medicine*, vol. 19, no 6, p. 971-977.
- Tahanian, E., L. A. Sanchez, T. C. Shiao, R. Roy et B. Annabi. 2011. Flavonoids targeting of IkappaB phosphorylation abrogates carcinogen-induced MMP-9 and COX-2 expression in human brain endothelial cells. *Drug design, development and therapy*, vol. 5, p. 299-309.
- Taketo, M. M. 1998. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (Part II). *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 90, no 21, p. 1609-1620.

- Tongyoo, A. 2010. Targeted therapy: novel agents against cancer. *Journal of the Medical Association of Thailand*, vol. 93 Suppl 7, p. S311-323.
- Trinchieri, G. 2011. Inflammation in cancer: a therapeutic target? *Oncology*, vol. 25, no 5, p. 418-420.
- Tveita, A., O. P. Rekvig et S. N. Zytkova. 2008. Glomerular matrix metalloproteinases and their regulators in the pathogenesis of lupus nephritis. *Arthritis research & therapy*, vol. 10, no 6, p. 229.
- Van den Steen, P. E., B. Dubois, I. Nelissen, P. M. Rudd, R. A. Dwek et G. Opdenakker. 2002. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, vol. 37, no 6, p. 375-536.
- Verhoeff, Joost J. C., Olaf van Tellingen, An Claes, Lukas J. A. Stalpers, Myra E. van Linde, Dirk J. Richel, William P. J. Leenders et Wouter R. van Furth. 2009. Concerns about anti-angiogenic treatment in patients with glioblastoma multiforme. *BMC cancer*, vol. 9, no 20015387, p. 444-444.
- Vivanco, I., et C. L. Sawyers. 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature reviews. Cancer*, vol. 2, no 7, p. 489-501.
- Von Hoff, D. D., P. M. LoRusso, C. M. Rudin, J. C. Reddy, R. L. Yauch, R. Tibes, G. J. Weiss, M. J. Borad, C. L. Hann, J. R. Brahmer, H. M. Mackey, B. L. Lum, W. C. Darbonne, J. C. Marsters, Jr., F. J. de Sauvage et J. A. Low. 2009. Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma. *The New England journal of medicine*, vol. 361, no 12, p. 1164-1172.
- Wang, S., Z. Liu, L. Wang et X. Zhang. 2009. NF-kappaB signaling pathway, inflammation and colorectal cancer. *Cellular & molecular immunology*, vol. 6, no 5, p. 327-334.
- Waubant, E. 2006. Biomarkers indicative of blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Disease markers*, vol. 22, no 4, p. 235-244.
- Wild-Bode, C., M. Weller, A. Rimner, J. Dichgans et W. Wick. 2001. Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma. *Cancer research*, vol. 61, no 6, p. 2744-2750.
- Woessner, J. F., Jr. 1991. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 5, no 8, p. 2145-2154.
- Wu, Y., et B. P. Zhou. 2010. TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *British journal of cancer*, vol. 102, no 4, p. 639-644.

- Yoshida, A., S. Yoshida, A. K. Khalil, T. Ishibashi et H. Inomata. 1998. Role of NF-kappaB-mediated interleukin-8 expression in intraocular neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science*, vol. 39, no 7, p. 1097-1106.
- Zetter, B. R. 1988. Angiogenesis. State of the art. *Chest*, vol. 93, no 3 Suppl, p. 159S-166S.
- Zhang, D., Q. Y. Ma, H. T. Hu et M. Zhang. 2010. beta2-adrenergic antagonists suppress pancreatic cancer cell invasion by inhibiting CREB, NFkappaB and AP-1. *Cancer biology & therapy*, vol. 10, no 1, p. 19-29.
- Zheng, C., Q. Yin et H. Wu. 2011. Structural studies of NF-kappaB signaling. *Cell research*, vol. 21, no 1, p. 183-195.